

**SYNTHESE VON TRYPTOPHAN-5-¹⁴C, DIE ANALYTIK SEINER
STOFFWECHSELPRODUKTE UND DER EINFLUSS VON
HYDROCORTISON AUF DEN KYNURENINABBAUWEG IN VIVO**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

1977

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Malte E. C. Förster
aus Beuthen (OS)

Düsseldorf 1976

**SYNTHESE VON TRYPTOPHAN-5-¹⁴C, DIE ANALYTIK SEINER
STOFFWECHSELPRODUKTE UND DER EINFLUSS VON
HYDROCORTISON AUF DEN KYNURENINABBAUWEG IN VIVO**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Malte E. C. Förster
aus Beuthen (OS)

Düsseldorf 1976

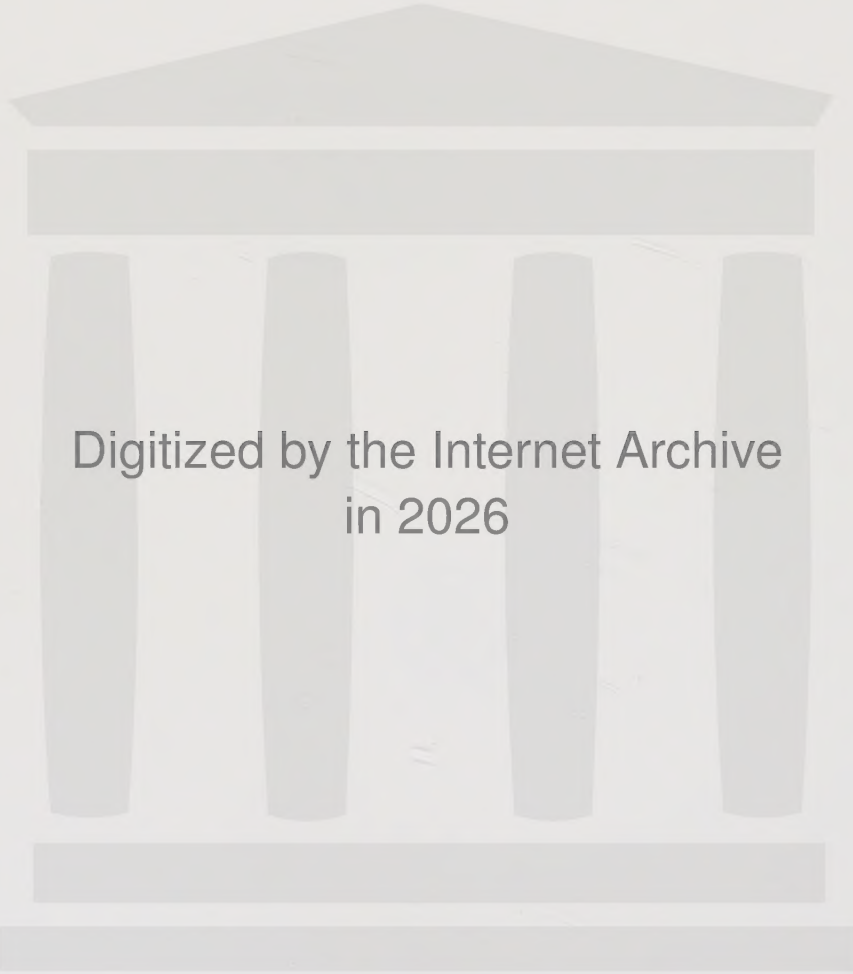


Meiner lieben Frau,

meinem Sohn

und

meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548220_0039

Referent: Prof. Dr. W. Staib

Korreferent: Prof. Dr. L. Birkofer

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 1977

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
II	Allgemeiner Teil	.
	1. Zur Geschichte des Tryptophans	3
	2. Tryptophan-Stoffwechsel und beteiligte Enzyme	5
	3. Den Kynureninweg beeinflussende Faktoren	8
	4. Der "paradoxe" Tryptophaneffekt	13
	5. Problemstellung	14
III	Spezieller Teil	
	1. Präparativer Teil (Methodik, Durchführung und Erörterung)	
	1.1. Mögliche Synthesewege und markierte Positionen	16
	1.2.1. Darstellung der Ausgangssubstanz:	
	3-Methyl-1,5-dibrompentan	20
	1.2.2. Reaktionen nach Grignard	23
	1.2.3. Reaktionen des dilithiierten	
	3-Methyl-1,5-dibrompentans	27
	1.2.4. Nitrilsynthese nach Kolbe	28
	1.2.5. Ringschlußreaktion	31
	1.2.6. Darstellung von Anilin	32
	1.2.7. Darstellung des Kondensationspartners:	
	4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd	33
	1.3. Präparation des Indolsystems nach Fischer	
	1.3.1. Darstellung des Phenylhydrazons	34
	1.3.2. Indolbildung nach Fischer	34

1.4.	Reinigung und Racematspaltung des DL-N-Acetyltryptophans	38
1.5.	Durchführung einer Synthese mit ^{14}C	39
2.	Analytischer Teil (Methodik, Durchführung und Erörterung)	
2.1.	Auswahl der Analysenmethodik	41
2.2.	Anwendung der Säulenchromatographie	42
2.3.	Anwendung der Dünnschichtchromatographie	43
2.3.1.	Vorbehandlung der Proben	45
2.3.2.	Fließmittelsysteme	47
2.3.3.	Auswertung der Dünnschichtchromatogramme	47
3.	Anwendung in Tierversuchen	
3.1.	Wirkungen der Induktion der Tryptophan- Dioxygenase	48
3.2.	Versuchsbeschreibung	49
3.3.	Ergebnisse	49
3.4.	Diskussion	51
IV	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
V	Experimenteller Teil	
1.	Arbeitsvorschriften zur Synthese	58
2.	Arbeitsvorschriften zur Analytik	96
3.	Durchführung der Tierversuche	107
VI	Literaturverzeichnis	109

I Einleitung

Tryptophan ist für den Menschen eine essentielle Aminosäure, von der er täglich minimal 0,25 g benötigt. Mit der Nahrung wird normalerweise ungefähr ein Gramm aufgenommen.

Unter den Aminosäuren nimmt Tryptophan eine besondere Stellung ein, weil es als einzige Aminosäure einen Indolkern besitzt und im Säugetierorganismus durch verschiedenartige biochemische Reaktionen zu einer Anzahl spezifischer Produkte umgesetzt wird. Dementsprechend zahlreich sind seine Stoffwechselprodukte sowie deren biologische Bedeutung.

Die Aufklärung des Metabolismus von Tryptophan ist bisher für eine Reihe verschiedener Wege gelungen (1). Tryptophan ist Vorläufer von Serotonin, einem Vasokonstriktor, und 5-Hydroxyindolessigsäure. Es kann nach Aufspaltung des Indolrings über den Kynureninweg zu 3-Hydroxyanthranilsäure und dann zu Nikotinamid metabolisiert werden. In der Säugetierleber wird der Benzolring auch oxydiert und über eine Anzahl von Schritten zu Glutarat, Acetat und Kohlendioxid abgebaut (Abb. 1, 2, 3).

Weiter ist Tryptophan Vorläufer der Indolsäuren, wie z.B. 3-Indolessigsäure. Beim Menschen wird diese

Substanz sowohl von Enzymen als auch von Bakterien im Darm hergestellt. Im Verdauungstrakt wird Tryptophan von Bakterien reduktiv zu Indol abgebaut, das resorbiert, in der Leber konjugiert und als Indikan ausgeschieden wird. Außer den verschiedenen Reaktionen, die mit dem Indolring oder der Seitenkette geschehen, wird Tryptophan auch in Proteine eingebaut.

Der Vielfalt der Stoffwechselprodukte entsprechend gibt es auch eine Reihe verschiedener Enzyme, die diese Umsetzungen vermitteln. Die Regelmechanismen dieser Enzyme sind jedoch weitgehend unbekannt. Großes Interesse erwuchs in neuer Zeit an ihnen, als offensichtlich wurde, daß sich der Stoffwechsel unter dem Einfluß von Östrogenen ändert. Auch andere Einflüsse, wie Brustkrebs, andere Krebsarten, Porphyrie, Arthritis, Pellagra, Asthma, Diabetes und Rauchen (2-5), werden diskutiert. Bei großem Tryptophanangebot wurden ebenfalls Änderungen seines Stoffwechsels festgestellt. In neuester Zeit wird Tryptophan sogar als "natürliches" Schlafmittel diskutiert; in Amerika ist die Reinsubstanz als Beruhigungsmittel bei speziellen psychischen Erkrankungen im Handel erhältlich.

Die Tatsache, daß immer wieder neue Metaboliten bei Mikroanalysen gefunden werden (6-8), spricht dafür, daß das Schicksal dieser Aminosäure weiterer Untersuchungen bedarf.

II Allgemeiner Teil

1. Zur Geschichte des Tryptophans

Ein kurzer Überblick über die Geschichte der Entdeckung des Tryptophans sowie der sich anschließenden Synthesewege findet sich bei Greenstein und Winitz (9).

Nach anfänglichen Versuchen von Bopp 1849 (10) gelang es erst 1902 Hopkins und Cole (11-13), Tryptophan aus organischem Material (Casein) zu isolieren. Die Ableitung der exakten Formel geschah 1906 durch Ellinger (14).

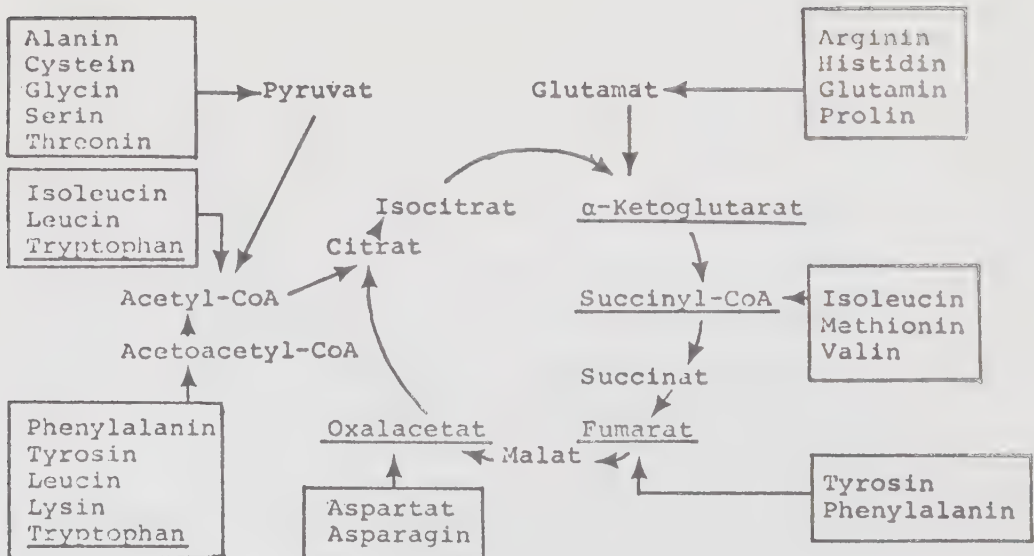
Anschließend erarbeitete Synthesewege gingen erst den Weg über den Indolaldehyd (z.B. Reimer-Tiemann Reaktion mit Indol, Chloroform und Kaliumhydroxid). Nachdem Mannich 1942 (15) die später nach ihm benannte Reaktion beschrieben hatte, wurde 1944 die erste Tryptophan-Synthese mit dieser Methode durchgeführt (16, 17).

Allen den bis hierhin geschilderten Synthesewegen ist der präformierte Indolring gemein. Die erste Synthese, bei der der Indolring erst während des Reaktionsweges entsteht, beschrieb Hegedüs 1946 (18); in der Folge wurden dann weitere Möglichkeiten untersucht (9).

Die berichteten Synthesen ergeben als Endprodukt DL-Tryptophan. Vom Säugetierorganismus wird aber nur L-Tryptophan als physiologisches Substrat umgesetzt, soweit nicht ein DL-konvertierendes Enzym vorhanden (19) oder D-Aminosäureoxydase (20) zum Tragen kommt. Der chemischen Synthese muß sich also eine Racemattrennung anschließen, um Nebeneffekte auszuschließen.

Abb. 1

Eintritt der Kohlenstoffgerüste aus den Aminosäuren
in den Citrat-Cyclus



2. Tryptophan-Stoffwechsel und beteiligte Enzyme

(Abb. 2, 3)

Der erste Schritt des Tryptophan-Abbauweges in Richtung Kynurenin wird durch die L-Tryptophan-2,3-dioxygenase (EC 1.13.11.11, andere Namen: Tryptophan-Pyrrolase, Tryptophanase, Tryptophan-Oxygenase, Tryptophandioxygenase) vermittelt.

Die Eigenschaften dieses Enzyms sind gut bekannt. Isoliert aus Rattenleber ist es alloster, tetramer, enthält 2 Mol Häm und 2 g-Atome Kupfer pro Mol Enzym. Die vermittelte Reaktion ist ein bi-unikinetischer Prozeß, bei dem L-Tryptophan zuerst an das Enzym gebunden wird und so einen Tryptophan-Enzym-Komplex bildet, der dann das zweite Substrat, Sauerstoff, bindet. So entsteht der aktive Enzym-Tryptophan-O₂-Komplex, der dann Tryptophan zu Formylkynurenin umsetzt. Obwohl die Geschwindigkeit eine hyperbolische Funktion der Sauerstoff-Konzentration ist, wird ein sigmoides Sättigungsverhalten in Abhängigkeit der Tryptophan-Konzentration beobachtet.

Durch Verwendung von 5-Fluortryptophan, welches nur am katalytisch aktiven Zentrum bindet, und α -Methyltryptophan, das nur am allosterischen Zentrum bindet, konnten die Konsequenzen einer Konformationsänderung und die kinetischen Auswirkungen bei Sättigung eines der Zentren untersucht werden (21).

Ergebnis der Tryptophan-Dioxygenase-Reaktion ist N-Formylkynurenin, das mit Formamidase (EC 3.5.1.9) weiter in Kynurenin umgewandelt wird. Mit Hilfe der Kynurenin-Hydroxylase (EC 1.14.13.9) wird dies zu 3-Hydroxykynurenin. Auf beide wirkt Kynureninase (EC 3.7.1.3), wobei einmal Anthranilsäure, zum anderen Hydroxyanthranilsäure entsteht. Weiter entstehen aus Kynurenin konjugierte Derivate und Kynurensäure, die im Urin ausgeschieden werden. Die aus Hydroxykynurenin entstehende Xanthurensäure sowie Konjugate treten ebenfalls im Urin auf. Hydroxykynurenin ist bei Insekten die Vorstufe der Ommochrome.

Aus der Hydroxyanthranilsäure entsteht mit dem Enzym 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxydase (EC 1.13.11.6) α -Amino- β -carboxymuconsäuresemialdehyd, der mit Pikolincarboxylase in α -Muconsäure umgesetzt wird, die einerseits Pikolinsäure, zum anderen über den Glutarat-Weg über Acetyl-CoA (Abb. 3) in den Zitronensäurezyklus eingeschleust wird.

Aus dem α -Amino- β -muconsäuresemialdehyd entsteht auch Chinolinsäure, die mit Hilfe der Chinolinat-transphosphoribosylase (EC 2.4.2.19) Nikotinsäureribonucleotid, dann N'-Methylnikotinamid und N'-Methyl-2-pyridon-3-carboxamid ergibt (NAD-Weg).

3. Den Kynureninweg beeinflussende Faktoren

Die Kapazität des Kynureninweges ist begrenzt; der Nachschub des Coenzyms Pyridoxalphosphat für die Kynureninase-Reaktion scheint der limitierende Faktor zu sein. Der Umsatz längs dieses Weges ist nämlich geringer, wenn Pyridoxalphosphat, wie bei Vitamin-B₆-Mangelzuständen, fehlt. Aber nicht nur bei Vitamin-B₆-Mangel erweist sich die Limitierung dieses Weges, es genügen erhöhte orale Tryptophangaben; danach werden Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und seine Metabolite (Acetylkynurenin, Kynurensäure und Xanthurensäure) vermehrt im Urin ausgeschieden. Es findet also eine Akkumulierung der von Kynureninase nicht umgesetzten Stoffwechselprodukte statt (22).

Wird nicht Tryptophan vermehrt angeboten, sondern die Tryptophan-Dioxygenase mit Hydrocortison induziert, ist der Einstrom in den Kynureninweg ebenfalls vergrößert. Altman und Greengard (23) fanden nämlich, daß nach Behandlung mit Hydrocortison erhöht Kynurenin ausgeschieden wird. Daß auch hier die Kynureninase-Reaktion der limitierende Schritt ist, zeigt die Behandlung mit Pyridoxin: Bewirkt wird eine Verringerung der ausgeschiedenen Mengen aller vier Metabolite (Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, Xanthurensäure und 3-Hydroxyanthranilsäure) auf Mengen, die gleich oder sogar geringer sind als ohne Hydrocortison-induktion.

Abb. 3: Abbau des Tryptophans zum Acetyl-CoA

Die Autoren fanden ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen Tryptophan-Dioxygenase Aktivität und Ausscheidung von Kynurenin nach Gabe von zwei Gramm Tryptophan. Sie schlossen daraus, daß die Dioxygenase nicht nur hormon-induzierbar, sondern auch durch Tryptophan selbst induziert werden kann. Sie lassen dabei offen, ob es sich um eine Aktivierung vorhandenen Enzyms oder um eine Enzymneusynthese handelt. Inzwischen wurde aufgeklärt, daß Tryptophan selbst den Abbau des Enzyms verlangsamt und vorhandenes Enzym aktiviert, Hydrocortison eine Neusynthese bewirkt.

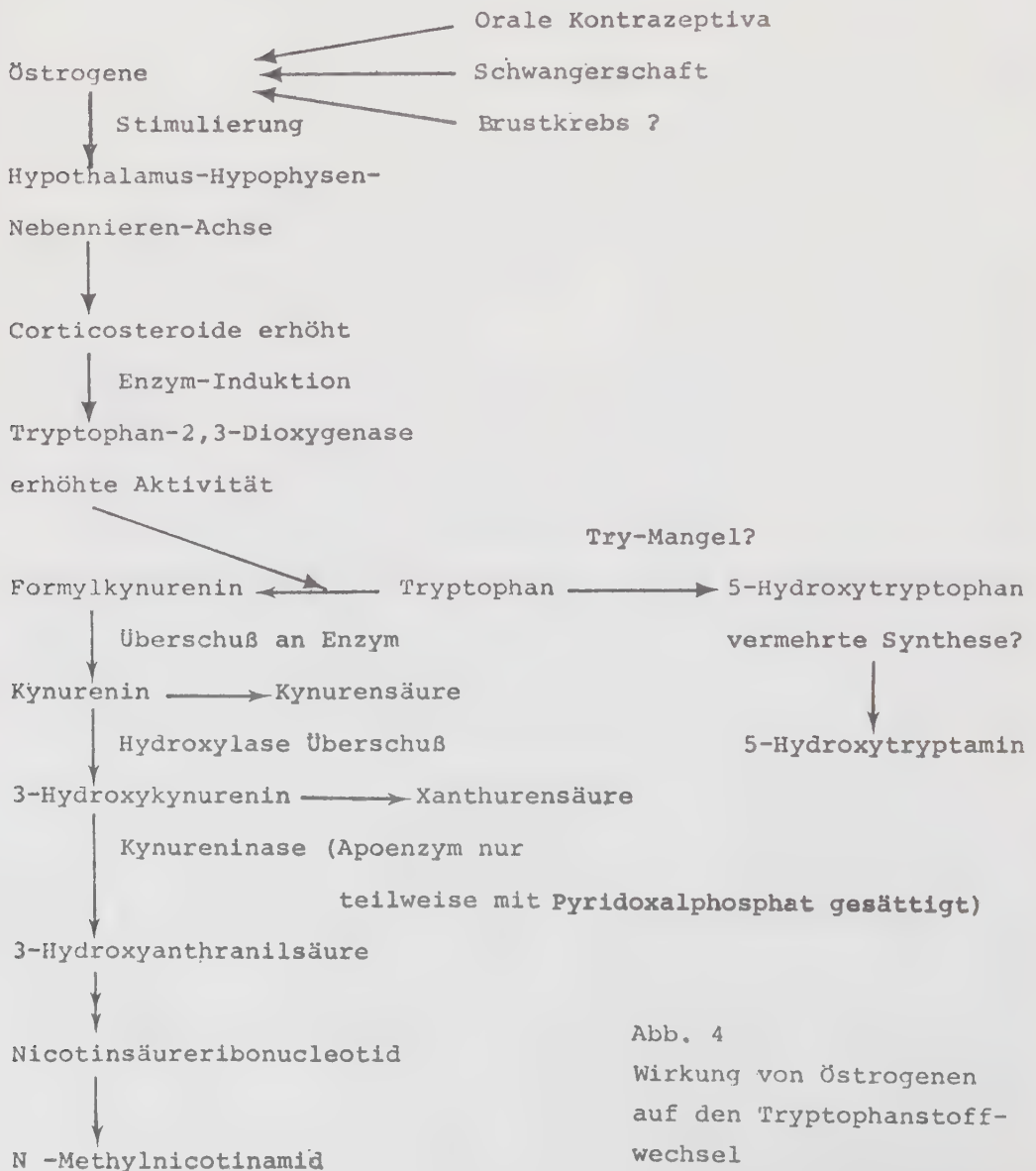
Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Betrachtung des Tryptophanstoffwechsels ist die erhöhte Ausscheidung von Xanthurensäure im Urin während der Schwangerschaft (24, 25). Nach Vitamin B₆-Gaben findet man eine Rückkehr auf normale Werte. Ein angenommener erhöhter Vitamin B₆-Bedarf des Foeten scheint aber nicht allein Grund für diese vermehrte Ausscheidung zu sein; der allgemein veränderte Hormonhaushalt während der Schwangerschaft verändert mindestens in gleichem Ausmaß den Tryptophanstoffwechsel in Richtung des Stoffwechselweges zu Nikotinsäureribonukleotid. Der Einfluß weiblicher Sexualhormone ist aber nicht nur auf die Schwangerschaft beschränkt, sondern ist während der verschiedenen Phasen des Menstruationszyklus ebenfalls wirksam. So wird zum Zeitpunkt der Ovulation eine erhöhte Ausscheidung von 3-Hydroxykynurenin, Xanthurensäure

und 3-Hydroxyanthranilsäure beobachtet; und hier erreicht die Östrogenaktivität ein Maximum im Verhältnis zur Menge unmittelbar nach der Menstruation. Weiterhin wird von verschiedenen Arbeitsgruppen ein geschlechtsabhängiger Unterschied in der Ausscheidung von Tryptophan-Metaboliten nach Tryptophan-Belastung gefunden (26).

Die Wirkung, die Östrogene auf die Nikotinsäure-ribonukleotid-Synthese haben, wurde noch deutlicher, als Rose (27) einen großen Anstieg der Xanthurensäure Ausscheidung bei Frauen beschrieb, die Östrogen-Progestagen Präparate als Kontrazeptiva einnahmen. Diese Beobachtung wurde nach Tryptophan-Belastung gemacht. Bei gleichzeitiger Gabe von Pyridoxin trat dieser Effekt ebenfalls nicht auf. Bei alleiniger Gabe von Östrogenen hat man den gleichen Befund wie bei den Kombinationspräparaten mit derselben Reaktion auf Pyridoxin. Die Progestagen-Komponente der kombinierten Präparate scheint nicht in den Stoffwechsel des Tryptophans einzugreifen, da eine Beeinflussung der Metaboliten nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden kann. (Abb. 4)

Wenig Informationen liegen bisher über den Einfluß von Androgenen vor, obwohl eine Untersuchung im Hinblick auf Stoffwechselveränderungen, die man bei Brustkrebs beobachtet, wichtig wäre. McGinty und Rose (28) fanden, daß bei Mesterolongabe nach oraler Tryptophanbelastung die

Metabolitenausscheidung sinkt, wie auch ein Ansteigen unterdrückt wird, das normalerweise nach Induktion der Tryptophan-2,3-Dioxygenase mit Hydrocortison erfolgt.



4. Der "paradoxe" Tryptophaneffekt

Foster, Ray und Lardy (29) beschrieben 1966 einen paradoxen in vivo Effekt des Tryptophans auf die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK). Sie fanden drei Effekte des Tryptophans auf die PEP-CK (EC 4.1.1.49):

- 1) Verdoppelung der PEP-CK-Aktivität innerhalb der ersten Stunde nach Tryptophan-Gabe und weitere langsame anschließende Aktivitätssteigerung;
- 2) Unterbindung der Hydrocortison aktivierten Gluconeogenese
- 3) Hemmung der Gluconeogenese aus Pyruvat, Malat und Aspartat, nicht aber aus Glukose und Glycerin.

In der Folge bestätigen weitere Arbeiten diesen Befund. Sie stellen heraus, daß L-Tryptophan die Fähigkeit besitzt, Lebergluconeogenese bei normalen Ratten zu hemmen. Die spezifische Aktivität aber des Schlüssel-enzym PEP-CK der Gluconeogenese wird in vitro vergrößert gefunden.

1974 erschien eine Arbeit von Alvares und Ray (30), die zeigt, daß eine gluconeogenetische Hemmung der PEP-CK nicht bei diabetischen Ratten gefunden wird. Bei ihnen scheint die Glukoneogenese nicht mehr unter einer normalen regulatorischen Kontrolle zu stehen. Es wird aber auch diskutiert, daß der Kynurenin-Abbaupfad des Tryptophans in Alloxan diabetischen

und depankreatierten Ratten verändert ist (31-34).

5. Problemstellung

Aus den geschilderten Befunden geht hervor, daß allein bei Betrachtung des Kynureninweges zahlreiche Probleme anstehen. Im Rahmen der in unserem Arbeitskreis durchgeführten Untersuchungen und erarbeiteten Methoden von Perfusionen und Zellpräparationen erschien es sinnvoll, auch auf den Tryptophanstoffwechsel näher einzugehen.

Da speziell ringmarkiertes Tryptophan nicht handelsüblich ist, sollten zu diesem Zweck die Methoden, die zur Synthese von Tryptophan beschrieben werden, auf ihre Eignung für ein einfaches, routinemäßig durchzuführendes Verfahren gesichtet werden. Die Methoden sollten erprobt und eine vollständige Synthese durchgeführt werden.

Weiter sollten zur Untersuchung des Tryptophanstoffwechsels entsprechende Analysenmethoden erarbeitet werden. Bisher beschriebene Methoden waren auf ihre Anwendbarkeit auf physiologische Flüssigkeiten, Anzahl der getrennten Substanzen, notwendige Vortrennungen und Quantifizierbarkeit hin durchzusehen und entsprechend unseren Anforderungen zu modifizieren.

Schließlich sollte zur Überprüfung der Anwendbarkeit der erarbeiteten Methoden in einer Vorstudie am Ganztiersversuch der Einfluß von Nebennierenrindenhormonen auf die Metabolitenverteilung des Tryptophans im Urin festgestellt werden.

III Spezieller Teil

1. Präparativer Teil

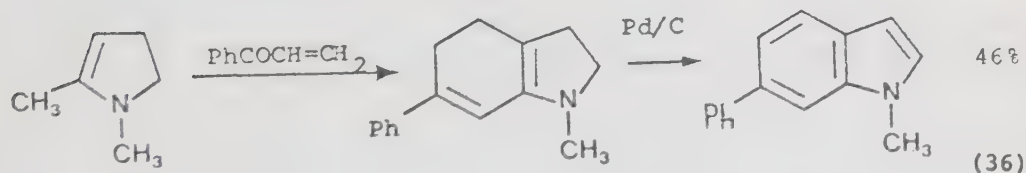
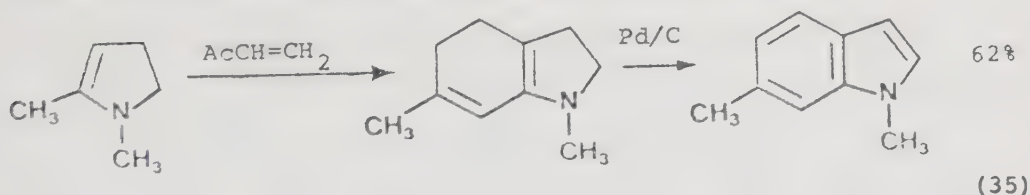
Methodik, Durchführung und Erörterung
(Syntheschema siehe Abb. 5)

1.1. Mögliche Synthesewege und markierte Positionen

Zum Studium des Kynureninstoffwechsels und der ihn beeinflussenden Faktoren ist eine Benzolringmarkierung des Indolsystems erforderlich, da im Laufe des Tryptophanstoffwechsels sowohl die Seitenkette abgespalten als auch der Pyrrolring geöffnet wird.

Es scheiden somit alle Synthesewege aus, die vom präformierten Indolring ausgehen. Da bisher noch keine Synthese beschrieben ist, die ausgehend von einem Molekül sowohl das Benzol- als auch das Pyrrolsystem durch Ringschlußreaktionen zu bilden vermag, muß folglich der Aufbau des Indolsystems schrittweise erfolgen. Weiter ist auch keine Synthese bekannt, die ausgehend von einem evtl. mehrfach substituierten Pyrrolring die Möglichkeit bietet, einerseits ein Benzolsystem am Pyrrolring (zur Bildung von Indol), sowie andererseits eine präformierte Seitenkette zu erhalten.

Dieser Weg hätte den Vorteil, daß ein markiertes C-Atom erst am Ende einer unter Umständen vieltstufigen Reaktion eingeführt würde. Verluste radioaktiver Substanz könnten auf diese Weise äußerst gering gehalten werden. Einen möglichen Ansatz für eine Indolsynthese dieser Art findet man 1958 und 1959 (35, 36). Dieser Weg ist aber weder hinreichend erprobt noch scheint er weiter verfolgt worden zu sein:

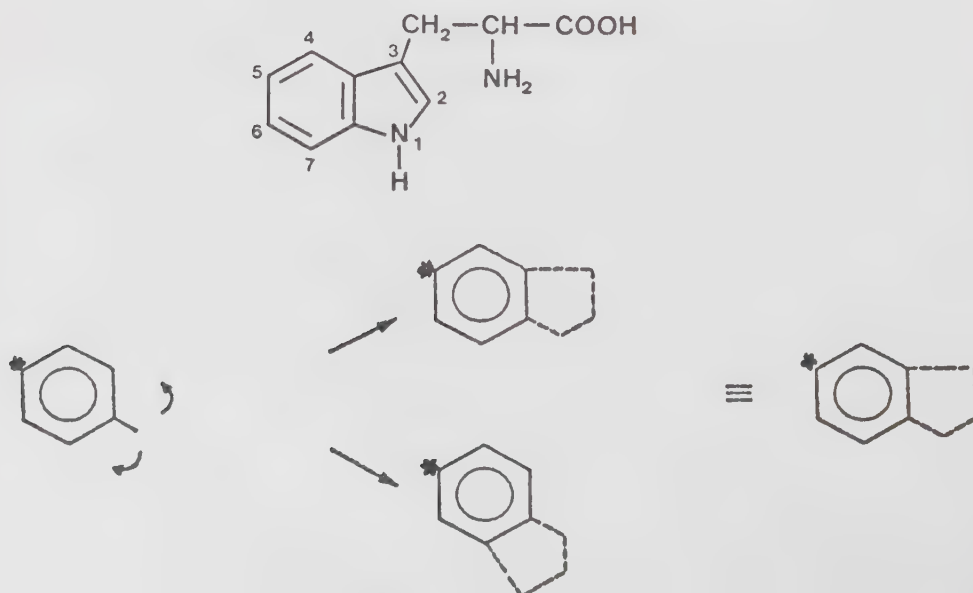


So muß also, ausgehend von einem substituierten Benzolsystem, nach einer der bekannten Indolsynthesen vorgegangen werden. Ein ^{14}C -Atom einzuführen, läßt sich am unproblematischsten mit Hilfe der Fischer'schen-Indolsynthese verwirklichen. Dazu wird ein entsprechendes Phenylhydrazon benötigt, das aus Anilin zu synthetisieren ist. Anilin selbst kann aus Toluol nach Oxidation zu Benzoesäure und Umlagerung nach Schmidt erhalten werden. Der Syntheseweg ist somit vorgegeben

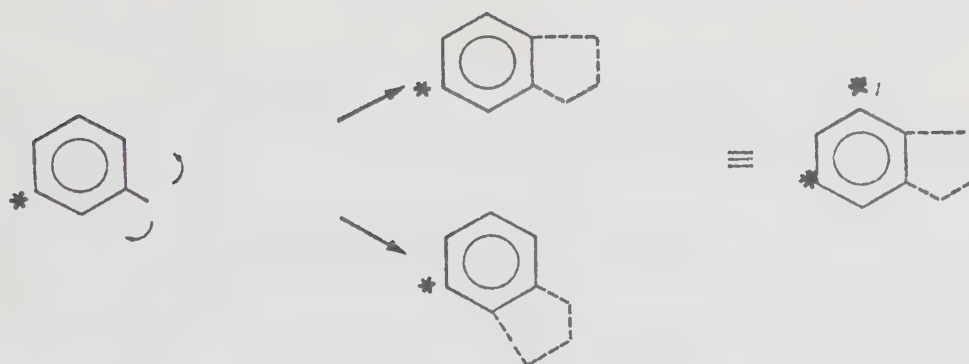
- Synthese eines ringmarkierten Toluols,
daraus Synthese von Phenylhydrazin (1.2.1. - 1.2.6.)
- Präparation des Kondensationspartners (1.2.7.)
- Kondensation
- Indolisierung (1.3.)
- Entfernen von Schutzgruppen
- Racemattrennung (1.4.)

Eine weitere Anforderung an den Syntheseweg ist, möglichst günstige Ausgangssubstanzen für die Markierung zu verwenden. Als solche kommt zuerst Bariumcarbonat- ^{14}C in Betracht. Dies kann auf routinemäßigem Weg umgesetzt werden zu Ameisensäure- ^{14}C , Natriumcyanid- ^{14}C oder Kaliumcyanid- ^{14}C .

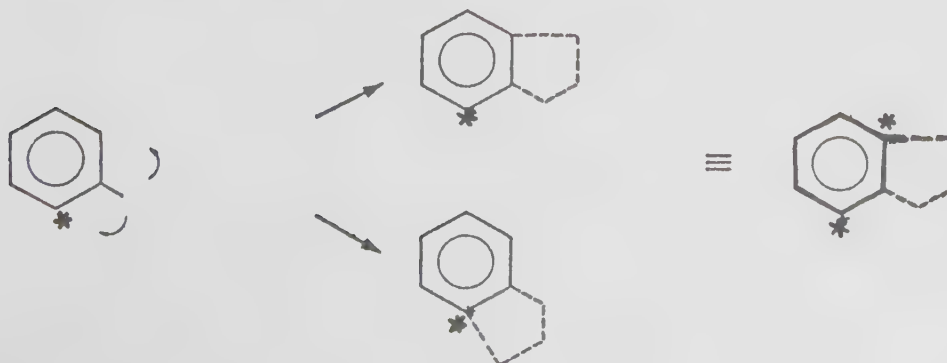
Eine Betrachtung des Tryptophanmoleküls zeigt, daß eine Markierung in Position 5 nach Durchführung



des Ringschlusses nach Fischer die einzige Möglichkeit ist, aus Anilin eine Einfachmarkierung zu erhalten. Geht man von einem in meta-Position markierten Anilin aus, erhält man zwei verschieden markierte Tryptophanmoleküle; das entspricht einer Doppelmarkierung, da die beiden Molekülarten nicht voneinander zu trennen sind.



Schließlich ergibt ein in ortho-Position markiertes Anilin eine Markierung im Benzolring (Position 7) und eine Markierung in Position 3a, einem C-Atom, das beiden Ringsystemen angehört.

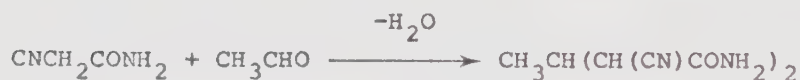


1.2.1. Darstellung der Ausgangssubstanz:

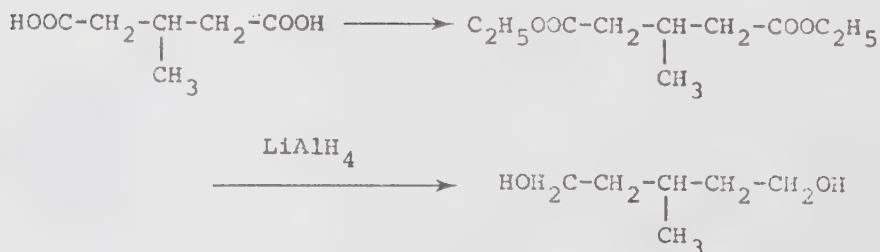
3-Methyl-1,5-dibrompentan

Als Ausgangsprodukt für eine Benzolringsynthese kommt ein methylsubstituiertes Pentan in Betracht, das zwei funktionelle Gruppen, an Position 1 und 5, für weitere Reaktionen zur Verfügung stellt. Bei den meisten in der Literatur beschriebenen Synthesen dient 3-Methyl-1,5-dibrompentan als Ausgangsprodukt für eine Toluolsynthese.

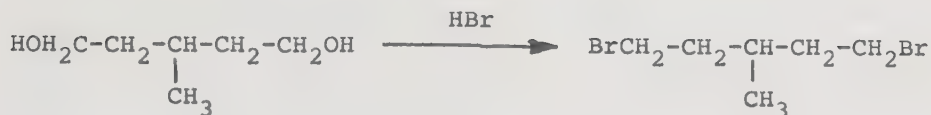
Es kann nach R. Kent und S. M. McElvain (39) aus Cyanacetamid gewonnen werden. Dazu wird dies mit folgenden Reaktionen umgesetzt:



Die entstandene 3-Methyl-1,5-pentandisäure (3-Methylglutarsäure) wird verestert (40) und anschließend mit LiAlH_4 zum 3-Methyl-1,5-dibrompentandiol reduziert (41).



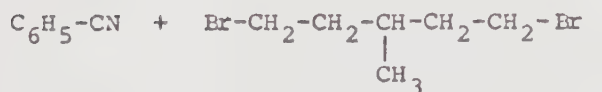
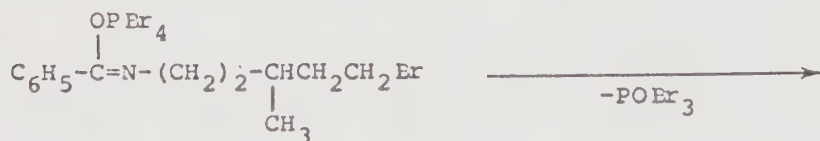
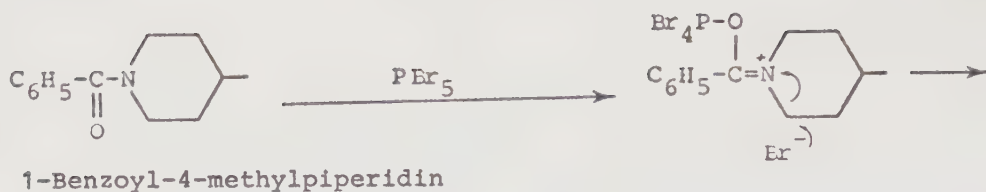
Das Diol wird mit HBr zu der entsprechenden Dibrom-
verbindung umgesetzt (41).



Diese Reaktionsfolge ergibt eine Gesamtausbeute
von 38% ausgehend vom Cyanoacetamid (39-41).

Ein anderer Weg geht aus vom 4-Pipecolin. Verwendet
man 3-Pipecolin, ist hier die Möglichkeit gegeben,
asymmetrisches, nämlich 2-Methyl-1,5-dibrompentan zu
erhalten. Die Pipecoline können aus den entsprechenden
Picolinen (Methylpyridinen) durch Reduktion mit naszierendem
Wasserstoff (Natrium/Alkohol) erhalten werden.

Nach Schotten-Baumann wird aus Methylpiperidin
1-Benzoylmethylpiperidin hergestellt (42). Umsetzung
mit Phosphorpentahalogenid (von Braun'sche Reaktion)
verwandelt das N-substituierte aromatische Carbonsäure-
amid in das entsprechende Nitril. Die vom Stickstoff
abgespaltenen C-Atome werden dabei nukleophil substituiert.



3-Methyl-1,5-dibrompentan

Der Umsetzung des 1-Benzoyl-4-methylpiperidins mit Phosphorpentabromid ist insofern Aufmerksamkeit zu widmen, als es sich hier um die Umsetzung in einer Schmelze handelt; dabei wird das Reaktionsprodukt laufend abdestilliert. Zu hohe Temperaturen führen zu Nebenreaktionen sowie zur Zersetzung des Reaktionsansatzes. Schonende Destillation bei möglichst niedrigen Temperaturen und Drücken beeinflussen die Ausbeuten günstig. Optimale Ergebnisse erzielt man, wenn die Destillation im Rotationsverdampfer vorgenommen wird. Die Temperatur darf dabei aus den oben genannten Gründen 150 °C nicht überschreiten.

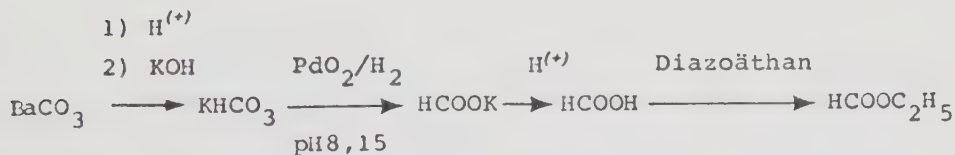
Da diese Reaktion in kurzer Zeit mit guten Ausbeuten (50 - 55 %) durchzuführen ist, wurde sie im Weiteren angewandt.

1.2.2. Reaktionen nach Grignard

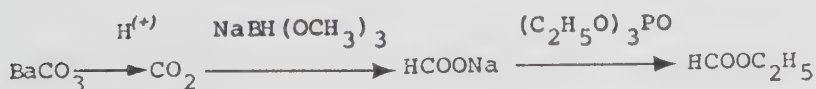
Mit 3-Methyl-1,5-dibrompentan hat man mehrere Möglichkeiten zur Ringschlußreaktion.

Umsetzung nach Grignard mit Ameisensäureäthylester (43).

Ameisensäureäthylester kann man auf zwei Wegen aus BaCO_3 gewinnen.

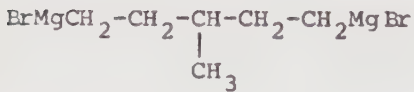
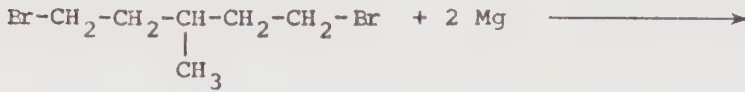


Die Freisetzung von Kohlendioxid mit anschließender katalytischer Reduktion zu Ameisensäure, Isolierung und Veresterung liefert 85%ige Ausbeute (41).

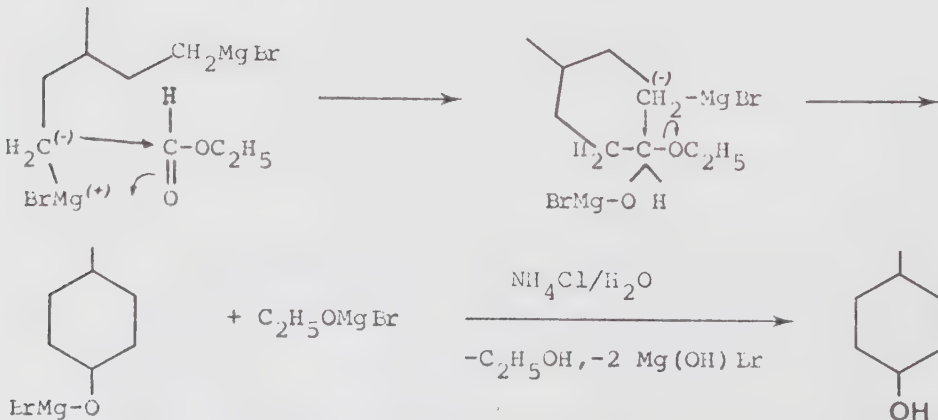


Eine Reduktion von Kohlendioxid zu Ameisensäure läßt sich nach (37, 44) im gasdichten Kolben unter inerten Bedingungen mit Natriumtrimethoxyborhydrid vornehmen. Diese Reaktion ist von mehreren Imponderabilien abhängig (Zeitdauer, Temperatur, schwankende Ausbeuten an Methanol als Nebenprodukt), da es sich hier um eine Zweiphasen-Reaktion handelt. Das spricht gegen einen routinemäßigen Einsatz dieser Methode zur Herstellung von markierter Ausgangssubstanz.

Umsetzung des 3-Methyl-1,5-dibrompentans in Diäthyläther mit Magnesium-Spänen (Reaktion nach Grignard) (40)



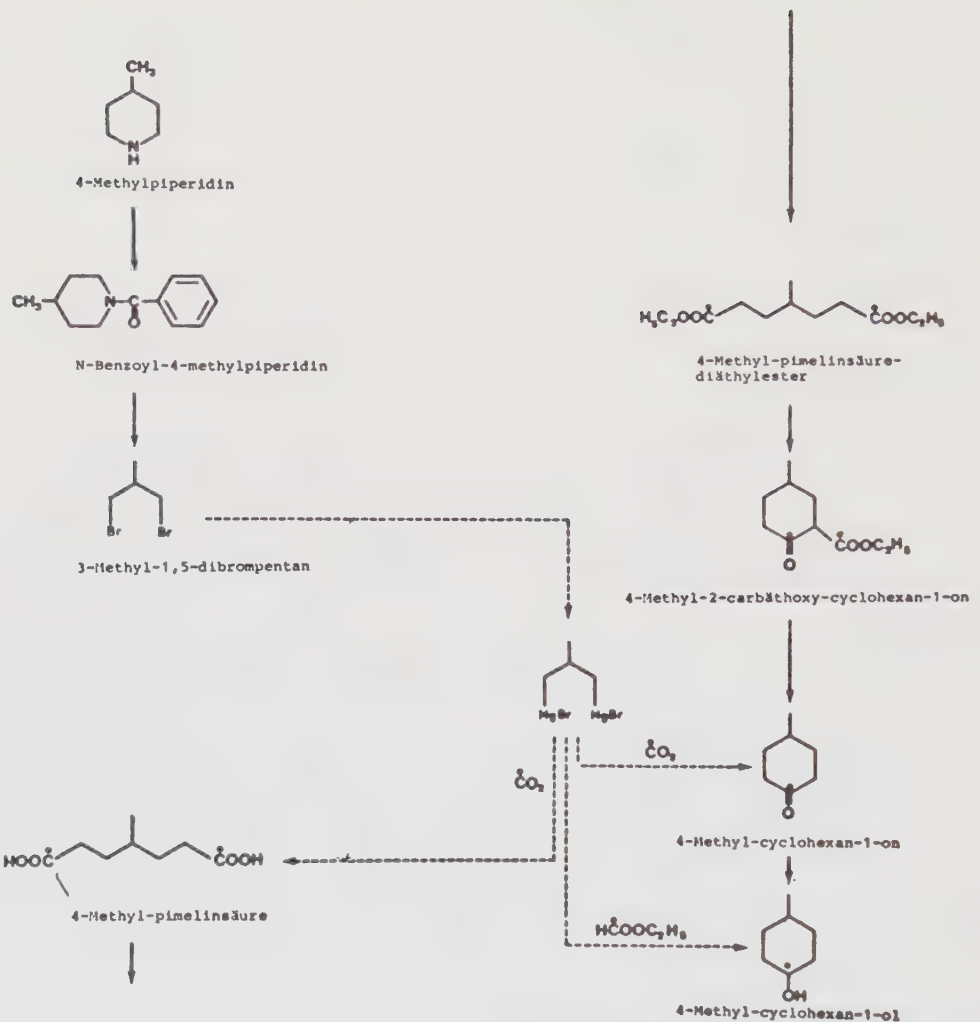
Bei der Durchführung dieser Reaktion wurde beobachtet, daß sich im Laufe der Umsetzung das sich bildende Grignard-Ätherat ölig absetzt und dabei nicht umgesetzte Magnesium-Späne einschließt. Da es sich um eine Digrignard-Verbindung handelt, wurde statt Diäthyläther Tetrahydrofuran als Lösungsmittel benutzt. So konnte eine quantitative Umsetzung erreicht werden. Anschließende Reaktion mit Ameisensäureäthylester ergibt das Produkt 4-Methylcyclohexanol in 70%iger Ausbeute. Umsetzung in Diäthyläther liefert dagegen nur 31%.



Mechanismus der Umsetzung der Digrignardverbindung des 3-Methyl-1,5-dibrompentans mit Ameisensäureäthylester

Nach Grignard und Vignon (45) liegt es hier jedoch nahe, auf die Reduktion des Kohlendioxids zur Ameisensäure zu verzichten und die Grignardlösung unmittelbar mit Kohlendioxid umzusetzen. Dabei soll 4-Methylcyclohexanon entstehen; weiter werden auch 4-Methylpimelinsäure und als Nebenprodukt das nach Wurtz entstehende Dimere als Dicarbonsäure erwartet. Aus der 4-Methylpimelinsäure läßt sich durch Metallsalzdestillation nach Ruzicka oder durch Cyclisierung nach Dieckmann 4-Methylcyclohexanon herstellen. Dies wiederum läßt sich durch Reduktion mit LiAlH_4 zu 4-Methylcyclohexanol umsetzen. Grignard beschreibt die Umsetzung des n-1,5-Dibrompentans mit nur qualitativen Angaben der Ausbeuten. Führt man diese Reaktion durch, erhält man das in diesem Fall als Hauptprodukt erwünschte 4-Methylcyclohexanon mit wechselnden und keineswegs in Hinblick auf die anschließenden Reaktionen genügend hohen Ausbeuten (10-20 %). Mit höheren Ausbeuten (30-50 %) entsteht die C_8 -Dicarbonsäure (siehe Schema S. 26).

Somit bietet dieser Weg nicht die erwarteten Vorteile.

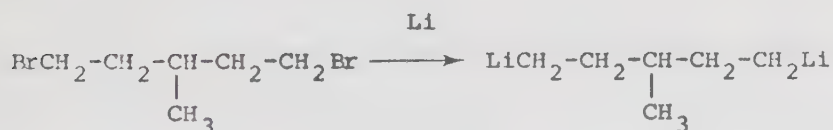


Schema der Umsetzung der Digrignardverbindung von
3-Methyl-1,5-dibrompentan mit Ameisensäureäthylester
und Kohlendioxid

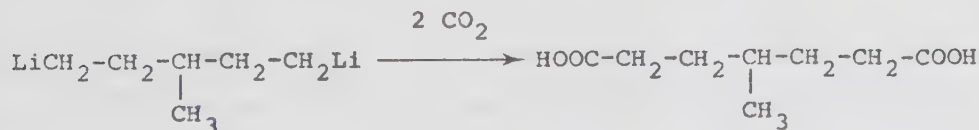
1.2.3. Reaktionen des dilithiierten 3-Methyl-1,5-dibrompentans

Entsteht durch Einleiten von Kohlendioxid in die Lösung des Alkylmagnesiumbromid als Hauptprodukt eine Dicarbonsäure, so liegt es nahe, auf anderem Wege diese Säure in höheren Ausbeuten gezielt zu synthetisieren.

Vorteilhafterweise präpariert man Dicarbonsäuren nicht nach Grignard, sondern setzt das Alkylbromid mit Lithium zu dem entsprechenden Dilithiumderivat um (46, 47):



Weitere Reaktion der lithiumorganischen Verbindung mit Kohlendioxid ergibt die entsprechende Dicarbonsäure, die 4-Methylpimelinsäure, in 27%iger Ausbeute.

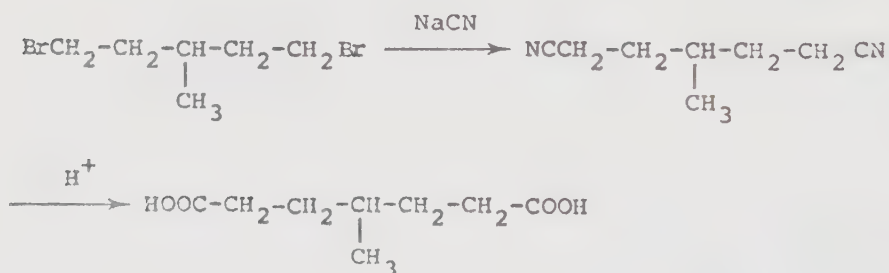


Die besten Ausbeuten bei der Umsetzung metallorganischer Verbindungen mit Kohlendioxid erhält man, wenn man die Lösung der metallorganischen Verbindung auf Kohlen-säureschnee tropfen läßt (48). Da diese Methode mit radioaktivem Kohlendioxid nur schwierig durchzuführen ist, wurde das gasförmige Kohlendioxid mit Hilfe eines

Vibrationsmischers eingeührt; die Ausbeuten sind dabei etwas niedriger (ca. 5 - 10%).

1.2.4. Nitrilsynthese nach Kolbe

Ein anderer Weg, der ebenfalls zur Methylheptandicarbonsäure führt, ist die Nitrilsynthese nach Kolbe. Vychovanec (49) beschreibt eine ähnliche Präparation.



Da in anderem Zusammenhang die Synthese radioaktiven Leucins für uns von Interesse ist, die nach der Nitrilsynthese vorgenommen wird, schien es sinnvoll, bei der Tryptophansynthese ebenfalls den Weg über das Nitril zu erproben. Durchführung der Reaktion in Dimethylsulfoxid verspricht ausgezeichnete Ausbeuten (50). Friedman und Shechter (51) erwähnen die Reaktion von Bromiden mit KCN; gut ausgearbeitet haben sie Reaktionen mit Chloriden und NaCN. Die Autoren sahen bei der Umsetzung von Chloriden mit KCN im Vergleich zu NaCN eine stark verlangsamte Substitution und bei Verwendung der Bromide statt der Chloride eine Zunahme von Konkurrenzreaktionen. Da es sich bei dem zu verwendenden

Alkyldibromid um ein verzweigtes Molekül handelt, das bei der Reaktion nicht unbedingt wie das n-Analoge verhält, wurde folgende Versuchsreihe durchgeführt:

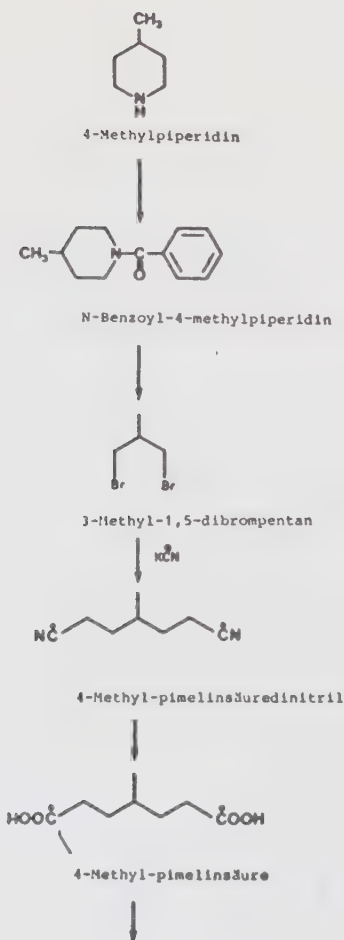
Reaktionstemperatur	Ausbeute	Tropfgeschwindigkeit
120-140 °C	44,2 %	6 Tropfen/min
80-120	30	60
60	61,7	60
50- 60	71	60
40	80	6
20	60,5	6

Die Zunahme der Ausbeuten mit abnehmender Reaktionstemperatur weist auf eine Abnahme der Konkurrenzreaktionen mit dem Lösungsmittel hin. Die Umsetzung bei 20°C zeigt aber auch, daß die Umsetzungsgeschwindigkeit abnimmt. Das kann einmal an der Menge des in DMSO gelösten KCN liegen, kann aber auch durch die immer stattfindenden Konkurrenzreaktionen des Halogenids mit dem Lösungsmittel limitiert sein. Man ersieht weiter, daß die Geschwindigkeit des Zutropfens stark verlangsamt sein muß, so daß immer genügend KCN aus dem Bodensatz in Lösung gehen kann, um an der Umsetzung teilzunehmen.

Das Optimum an Ausbeute erhält man demnach bei 40°C, langsamer Tropfgeschwindigkeit und langem Nachrühren.

Auftretende Nebenreaktionen, wie Dehydrobromierungen und Dimerisierungen, werden hierbei minimalisiert.

Anschließend wird das Dinitril zur Dicarbonsäure verseift (52). Die ermittelten Ausbeuten von insgesamt 65 bis 70 % liegen über denen der anderen Verfahren, so daß dieser Weg für die weitere Präparation bevorzugt wurde.

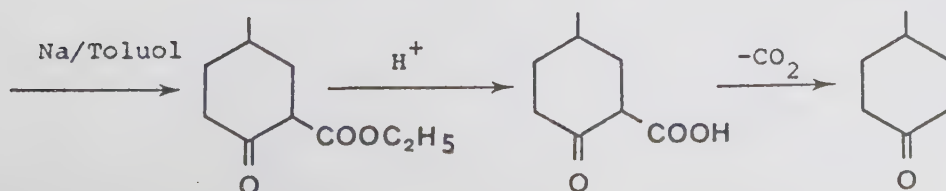
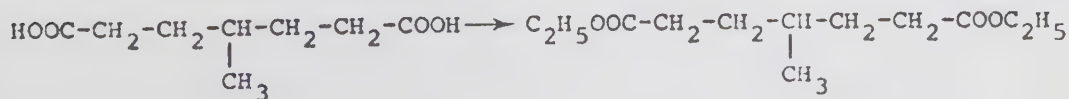


Schema der Nitrilsynthese
nach Kolbe

1.2.5. Ringschlußreaktion

Erhitzt man C_6 - oder C_7 -Dicarbonsäuren trocken mit Ca^{2+} - oder Ba^{2+} -Salzen, so erhält man unter Decarboxylierung die um ein C-Atom ärmeren Cycloalkylketone (Blanc'sche Regel) (53).

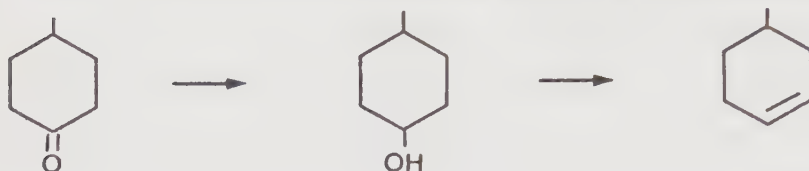
Trockenes Erhitzen der 4-Methylpimelinsäure mit den entsprechenden Erdalkaliverbindungen führte merkwürdigerweise nicht in guten Ausbeuten zum erwünschten Produkt 4-Methylcyclohexanon. Eine Kontrolle mit den n-Dicarbonsäuren Adipinsäure und Pimelinsäure erwies jedoch, daß die Reaktionsbedingungen angemessen gewählt waren. So wurde, um auch im Halbmikromaßstab ausreichende Ausbeuten erhalten zu können, der Ringschlußreaktion nach Dieckmann (54) der Vorzug gegeben. Dazu wird die 4-Methylpimelinsäure zum Diäthylester nach Fischer-Speier (55) umgesetzt, der anschließend mit Natrium-Emulsion in Toluol zum 4-Methyl-2-carbäthoxycyclohexan-1-on cyclisiert wird. Dieser dargestellte Ester wird anschließend sauer verseift, und die dabei entstehende β -Dicarbonsäure decarboxyliert spontan unter Hitzeeinwirkung. Zu bemerken ist an dieser Stelle, daß die Decarboxylierung bei der ^{14}C -markierten Synthese unter Freiwerden eines $^{14}CO_2$ abläuft. Dieses Kohlendioxid wird in $Ba(OH)_2$ absorbiert und kann für weitere Synthesen verwendet werden.



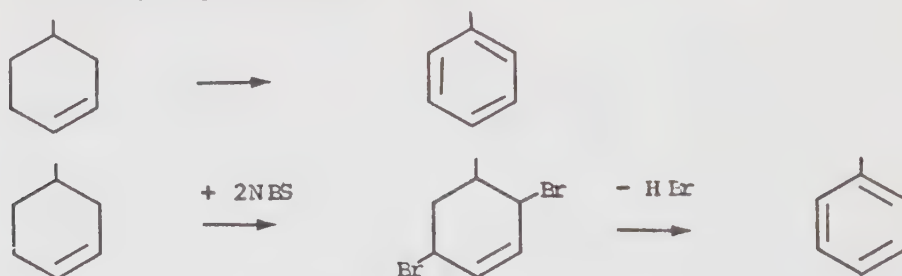
1.2.6. Darstellung von Anilin

Das erhaltene 4-Methylcyclohexanon wird mit LiAlH_4 zu 4-Methylcyclohexanol reduziert (57-60).

Anschließende Dehydratisierung ergibt 4-Methylcyclohexen (61).

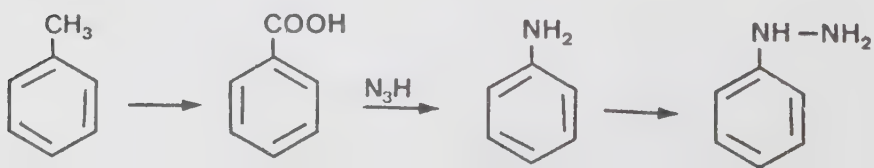


Katalytische Dehydrierung nach Johnston (62) oder Umsetzung mit N-Bromsuccinimid (63-66) mit anschließender Dehydrobromierung ergibt Toluol (67).



Mit den gebräuchlichen Verfahren wird Toluol zu Benzoesäure oxydiert (KMnO_4 , 68), die mit Stickstoffwasserstoffsäure Anilin ergibt (Abbau nach Schmidt, 69).

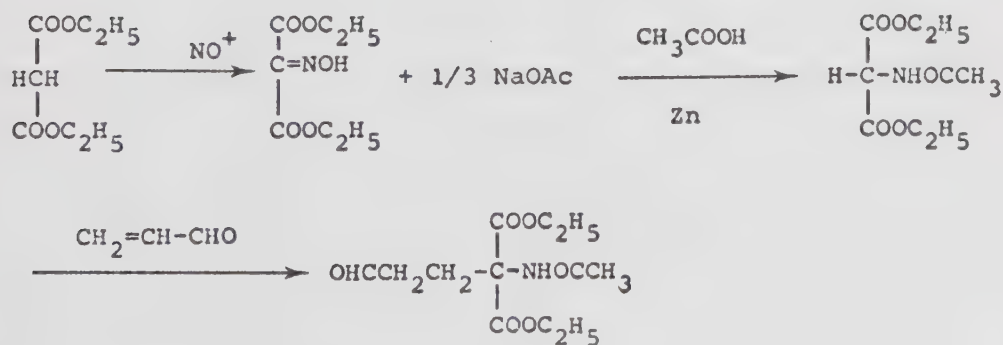
Umsetzung des isolierten Anilinhydrochlorids mit HNO_2 und Reduktion mit Schwefeldioxid führt zum Phenylhydrazin (70, 71), das als Ausgangsprodukt für das bei der Indolsynthese nach Fischer benötigte Phenylhydrazon dient.



1.2.7. Darstellung des Kondensationspartners:

4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd

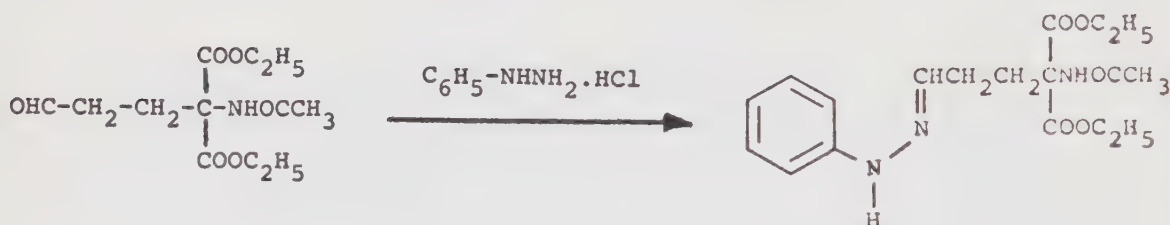
Als Kondensationspartner mit Phenylhydrazin zur Vorstufe der Fischer'schen Indolsynthese wird 4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd benötigt. Dazu wird Malonsäurediäthylester zuerst zum Isonitrosomalonsäurediäthylester umgesetzt, der als Natriumacetat-Additionsprodukt isoliert wird (72). Weitere Reduktion in Eisessig/Acetanhydrid mit Zinkstaub führt zum Acetaminomalonsäurediäthylester (73). Anlagerung von Acrolein in Benzol oder Äthanol unter Anwesenheit eines basischen Katalysators ergibt den 4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd (74).



1.3. Präparation des Indolsystems nach Fischer

1.3.1. Darstellung des Phenylhydrazons

4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd wird mit Phenylhydraziniumchlorid in wässrigem Äthanol umgesetzt und ergibt das entsprechende Phenylhydrazon(75).



1.3.2. Indolbildung nach Fischer

Ein wichtiger Schritt dieser Synthese aus Anilin ist die Ringschlußreaktion nach Fischer (76). Sie kann als eine Eliminierungsreaktion von Ammoniak aus dem Arylhydrazon eines Aldehyds oder eines Ketons durch Behandeln mit einer Säure oder verschiedenen Metallen und wasserfreien Metallsalzen unter Bildung eines Indolkerns betrachtet werden. Fischer und Jourdan (77) indolisierten erstmals 1893 Pyruvat-1-methylphenylhydrazon mit alkoholischer HCl und identifizierten das Produkt dieser Reaktion 1884 als 1-Methylindol-2-carbonsäure (78).

Einen Mechanismus der Reaktion schlugen 1918 Robinson et al. (79) vor; er wurde 1943 von Allen und Wilson (80) erweitert und 1948 von Carlin und Fischer (81) elektronentheoretisch diskutiert. Danach verläuft die Reaktion über drei maßgebliche Schritte:

- 1) Hydrazon-Enhydrazin Gleichgewicht
- 2) Bildung der neuen C-C Bindung
- 3) Verlust des Ammoniaks.

Der zur Verwendung kommende Katalysator soll sauer sein, da im Verlauf der Reaktion jeder weitere Schritt zu einer stärkeren Basizität im Reaktionsansatz führt, letztlich durch Freiwerden des Ammoniaks (79). Es wurde jedoch gezeigt, daß nach Tautomerisation des Hydrazons die Indolbildung unabhängig von einer sauren Katalyse ist, obwohl sie durch einen sauren Katalysator beschleunigt abläuft. Daraus ergibt sich, daß der Katalysator vor allem die Gleichgewichtseinstellung zum Enhydrazin beschleunigt und dies wahrscheinlich durch Protonierung oder Komplexbildung stabilisiert. (82).

Für die Tryptophansynthese war ein geeigneter Katalysator zu finden:

Katalysator	Ausbeuten	
wässrige Schwefelsäure	(100 + 13)	73 %
wässrige, äthanolische Schwefelsäure	(80+20+15)	55-65 %
wässrige, äthanolische Schwefelsäure	(50+50+15)	40-50 %
Äthanol/Salzsäure	(100+13)	40-50 %
saurer Ionenaustauscher (Amberlite IR 120)		
(in Äthanol/Wasser 80+20)		35-40 %

Aus der Tabelle ersieht man, daß wässrige Schwefelsäure die besten Ergebnisse liefert. Zusatz von Äthanol als Lösungsvermittler für das sonst in Wasser nicht lösliche Phenylhydrazon ergibt keine höheren Ausbeuten. Die Präparation mit einem sauren Ionenaustauscher bringt keine Vorteile, weil durch die lange Zeit einwirkende Siedehitze die Matrix des Tauschers angegriffen zu werden scheint und eine anschließende Reinigung des Produktes mit Einbußen an Substanz verbunden ist.

Nach Indolisierung des Phenylhydrazons (75) werden die beiden Estergruppen alkalisch verseift (83). Anschließendes schonendes Ansäuern verläuft unter Decarboxylierung zum DL-N-Acetyltryptophan (84).

1.4. Reinigung und Racematspaltung des

DL-N-Acetyltryptophans

DL-N-Acetyltryptophan wird zur Reinigung einer Säulenchromatographie unterworfen. Die Absorption des Eluats wird registriert, das Eluat fraktioniert. Bei der radioaktiv-markierten Substanz werden die einzelnen Fraktionen im LSC-Counter auf ihre Aktivität vermessen. Die Abbildung 7 (im experimentellen Teil) zeigt, daß sich optische Absorption und gemessene Aktivität decken. Nach Vereinigung der das Acetyltryptophan enthaltenden Fraktionen folgt die Racemat-trennung.

Eine Racematspaltung ist auf verschiedenen Wegen zu erreichen (9):

DL-Tryptophan kann als Chloracetylderivat mit Pankreascarboxypeptidase gespalten werden, die aber ebensowenig wie Nieren-Acylase I DL-Acetyltryptophan umzusetzen vermag.

DL-Acetyltryptophan läßt sich jedoch mit Schimmel-Acylase aus *Aspergillus flavus-oryzae* oder Acylase I aus Schweineniere (N-Acylaminosäure-aminohydrolase, EC 3.5.1.14) auftrennen, die beide nur das L-Derivat umsetzen. D-Acetyltryptophan läßt sich aus den eingengten Mutterlaugen in 90%iger Ausbeute wiedergewinnen.

Nach Hydrolyse zum D-Tryptophan und erneuter Racemiesierung durch Präparation des Acetylderivates hat man die Möglichkeit, noch einmal L-Tryptophan zu gewinnen. Als Reinheitskriterien dienen der Mischschmelzpunkt und die Messung des optischen Drehwinkels.

1.5. Durchführung einer Synthese mit ^{14}C

Nach Erprobung des Syntheseweges mit Kaliumcyanid wurde eine Synthese mit K^{14}CN durchgeführt. Die dabei über die Radioaktivität gemessenen Ausbeuten stimmen gut mit den chemisch ermittelten überein. Ausgehend von K^{14}CN mit einer Aktivität von 45,6 mCi wurden 15,4 μCi L-Tryptophan-5- ^{14}C erhalten. Das Präparat entsprach den üblichen Reinheitsbedingungen (Schmelzpunkt, optischer Drehwinkel und Isotopenverdünnung mit L-Tryptophan als Bezugssubstanz).

Da für Tierversuche Dosen von 30 bis 50 μCi L-Tryptophan sinnvoll eingesetzt werden können, muß in weiteren Arbeiten mit entsprechend höherer Ausgangsaktivität gearbeitet werden.

2. Analytischer Teil (Methodik, Durchführung und Erörterung)

2.1. Auswahl der Analysenmethodik

Aus dem oben skizzierten Tryptophanstoffwechsel ersieht man, daß eine große Anzahl Substanzen aus dem Metabolismus resultiert, die unterschiedliches chemisches Verhalten zeigen. Als Folge werden eine Vielfalt analytischer Verfahren beschrieben, die das gesamte Spektrum analytischer Methoden von Extraktionsmethoden bis zu mannigfachen chromatographischen Verfahren umfassen:

- Gaschromatografie, die sich auf rein organische Verbindungen oder Substanzen, von denen sich die HMDS-, TMCS-, BSA-Derivate⁺ oder methylierte Produkte darstellen lassen, beschränkt (85, 87, 88),
- Papier- (86) und Dünnschichtchromatographie, die zumindest vorbereitende Extraktionen benötigen,
- Säulenchromatographie und Ionenaustauscherchromatographie, die meistens mit mehreren Säulenmaterialien, Puffersystemen und komplexen Gradienten arbeiten (89 - 92).

Von vornherein scheiden die Methoden aus, die nur eine beschränkte Anzahl von Metaboliten zu trennen gestatten, so daß sich das Interesse vor allem auf die Säulen- und Dünnschichtchromatographie konzentrierte.

+ HMDS = Hexamethyldisilazan
TMCS = Trimethylchlorsilan
BSA = N,O-Bis-(trimethylsilyl)acetamid

2.2. Anwendung der Säulenchromatographie

Bakri beschrieb 1970 (89) ein Verfahren, das mit zwei hintereinandergeschalteten Säulen (QAE-A 25 Sephadex, einem Dextran-Gel-Ionenaustauscher, und Carboxymethylcellulose (CMC), einem Celluloseionen-austauscher) arbeitet. Die Elution erfolgt derart, daß zuerst die basischen Substanzen, die von der QAE-A 25 Sephadex-Säule ausgewaschen werden, unmittelbar auf die CMC-Säule aufgespült werden. Eine Trennung erfolgt anschließend mit zwei verschiedenen Gradienten.

Bei der Durchführung dieser Säulenchromatographie zeigte sich, daß die Säulen, so wie in (89) beschrieben, nicht ohne Schwierigkeiten zu handhaben waren; dies kann man schon aus den angegebenen Säulendurchmessern ersehen: zur Verwendung kommen Säulen mit den Abmessungen 0,94 x 100 cm (QAE-A 25 Sephadex) und 0,94 x 50 cm (CMC). Während die 50 cm lange Säule mit einer Peristaltikpumpe noch gut auch mit Gradient eluiert werden konnte, stellten sich bei der 100 cm langen Säule mit Sephadex-Material Schwierigkeiten ein. Zum ersten konnte gerade noch mit der zur Verfügung stehenden Pumpe die Säule äquilibriert werden, die geschilderte Flußgeschwindigkeit während der Probenelution konnte aber in keinem Fall erreicht werden; ganz im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Flußrate am Ende der Elution, die nach Vorschrift sogar noch gesteigert werden sollte, war es

trotz Erhöhung des Drucks nicht möglich, die anfangs erreichte Flußrate aufrecht zu halten. Eine Steigerung am Ende war ganz und gar unmöglich. Zum zweiten schrumpfte naturgemäß der Ionenaustauscher während der Elution mit dem Gradienten und kam nach erneuter Äquilibration auch nicht wieder auf sein altes Volumen, verursacht augenscheinlich durch die vorher notwendige Druckerhöhung sowie die Anwendung des Gradienten. So konnten bei zwei aufeinanderfolgenden Analysen weder die gleichen Trennergebnisse noch gleiche Retentionszeiten ermittelt werden. Eine neugepackte Säule zeigte beim ersten Analysengang ähnliche Ergebnisse, verhielt sich aber gegenüber dem Gradienten in gleicher Weise. Daneben haben die zur Elution verwendeten Gradienten den Nachteil, anschließend im Eluat neben den getrennten Substanzen enthalten zu sein.

Ein derartiges Verfahren, dem zur besseren Trennung der zu untersuchenden Metaboliten ebenfalls eine Vorbehandlung vorausgehen muß, sind weder für einen schnellen noch für einen reproduzierbaren Analysengang brauchbar, ganz abzusehen von einem routinemäßigen Einsatz.

2.3. Anwendung der Dünnschichtchromatographie

Eine Alternative zur Säulenchromatographie bietet hier die Dünnschichtchromatographie. Kurze Analysenzeiten, ausgezeichnete Trennungen sowie kommerziell erhältliche

beschichtete Platten gleichbleibender Qualität, die unabwägbare Einflüsse auf ein Minimum reduzieren, liefern beste Voraussetzungen für ein schnelles Routineverfahren, bei dem gleichzeitig qualitative wie auch quantitative Auswertemöglichkeiten gegeben sind.

Eine große Anzahl von Publikationen beschreiben seit 1970 theoretische und apparative Voraussetzungen für die quantitative Erfassung von Substanzen auf der Dünnschichtplatte (95-108). Kommerziell erhältliche Geräte bieten seit geraumer Zeit die Möglichkeit, Dünnschichtplatten im Durchlicht densitometrisch zu vermessen. Neueste Geräte besitzen getrennte, den interessierenden Wellenlängenbereich automatisch durchfahrende Monochromatoren, automatischen Plattenanschub mit gleichzeitiger Aufzeichnung der Remission sowie die Möglichkeit, Fluoreszenzmessungen und Fluoreszenzminderungsmessungen in Remission vornehmen zu können. Es sind auch Geräte erhältlich, die analog zu Zweistrahl-spektralphotometern in Remission den von der Platte erzeugten Untergrund kompensieren.

Eine Einschränkung war jedoch für die optische Auswertung gegeben. Kein Analysengerät beherrscht zur Zeit die Auswertung zweidimensional gelaufener Platten. Der Grund ist darin zu sehen, daß im allgemeinen ein Lichtstrahl von einer Schlitzblende projiziert und als einfallendes Licht benutzt wird. Ein solcher Schlitz

erzeugt einen Strahl, der ein schmales Lichtband auf eine runde oder elliptische Zone projiziert, in der die Probe nicht einheitlich verteilt ist. So ergeben zweidimensional entwickelte Platten oftmals verzerrte, nicht mehr runde Flecken, deren Vermessung schwierig ist. Solche Schwierigkeiten ersieht man daraus, daß man bei verschiedenen Scanrichtungen der Platte unterschiedliche Remissionswerte erhält (95).

Mit dem uns zur Verfügung stehenden Gerät war also eine eindimensionale Entwicklung vorgegeben. Ausgehend von der von Haworth und Walmsley (93) sowie der von Anderson (94) modifizierten beschriebenen zweidimensionalen Metabolitentrennung wurde versucht, mit Hilfe einer Vortrennung zu eindimensionalen Entwicklungsläufen zu gelangen.

2.3.1. Vorbehandlung der Proben

Den eigentlichen Chromatographieläufen wurde eine Vortrennung vorangestellt. Da es sich, wie schon bei der Säulenchromatographie geschildert wurde, um Substanzen verschiedener Acidität bzw. Basizität handelt, war eine Extraktion aus wässrigen (und somit auch physiologischen) Medien bei verschiedenen pH-Werten erfolgversprechend. Allerdings führte eine Extraktion bei variiertem pH-Wert (pH 9-10, dann 3-5) mit einem Lösungsmittel allein zu keinen

guten Extraktionsergebnissen. Lösungsmittelmischungen apolaren Charakters schienen ebenfalls nicht erfolgversprechend, da polare Substanzen in der wässrigen Phase zurückbleiben würden. Erst Mischungen von apolaren Lösungsmitteln mit höheren Alkoholen führten zu dem gewünschten Resultat im sauren und alkalischen Bereich. Amphotere Substanzen, wie z.B. Tryptophan selbst, bleiben im wässrigen Medium. Engt man nach den Extraktionen zur Trockne ein, lassen sich diese Substanzen ebenfalls aus dem Kristallisat extrahieren.

Dies bestätigen Arbeiten von Sprince et al. (109), der mit Diäthyläther und Butanon unter alkalischen Bedingungen eine Vortrennung zur papierchromatographischen Analyse von Tryptophanmetaboliten erreichte sowie eine zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen erschienene Arbeit von Byrd et al. (6), der ternäre Gemische ähnlicher Zusammensetzung wie die aus den oben geschilderten Versuchen gefundenen bei verschiedenen pH-Werten benutzte.

Die Vortrennung wurde letztlich folgendermaßen durchgeführt: Die wässrige Probe (ein Testgemisch oder Natriumchlorid-gesättigter Urin) wird zuerst bei pH 10-11 mit Diäthyläther/Cyclohexan/t-Butanol extrahiert. Anschließend wird mit Salzsäure auf pH 3-5 gebracht und erneut mit diesem Lösungsmittelgemisch extrahiert. Die nunmehr verbleibende wässrige

Phase wird bei leichtem Vakuum zur Trockne eingengt und anschließend mit Tetrachlorkohlenstoff/Äthanol/Ammoniak dreimal extrahiert. Die Extrakte werden zur Trockne eingengt, mit einer definierten Menge Methanol aufgenommen und können bis zur Chromatografie in der Kälte gelagert werden.

2.3.2. Fließmittelsysteme

Die in der Literatur beschriebenen Fließmittelsysteme sind entsprechend den aufzutrennenden Substanzen unterschiedlichster Zusammensetzung und Polarität. Einen Überblick über bisher erprobte Systeme findet man bei H. Kaldewey (128).

Eine Übersicht über die hier angewandten Fließmittelsysteme findet man in Tabelle 1, die R_F -Werte der erprobten Substanzen in diesen Systemen enthält. Tabelle 2 im experimentellen Teil.

2.3.3. Auswertung der Dünnschichtchromatogramme

Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte nach der optischen Remissionsmethode. Dabei war aus jeder Platte ein Standardextrakt aufgebracht, der als Referenz diente. Die Auswertung der Schriebe erfolgte auf die übliche Art mit Hilfe von Eichkurven.

3. Anwendung in Tierversuchen

3.1. Wirkungen der Induktion von Tryptophan-Oxygenase

Die oben beschriebenen Methoden werden in folgenden Tierversuchen angewandt. Es wird die Verteilung von drei Metaboliten des Tryptophan im Urin von Ratten exemplarisch untersucht. Es soll der Einfluß von Tryptophangaben und Hydrocortison aufgezeigt werden.

Von Interesse sind diese Untersuchungen, weil in der oben erwähnten Literatur ein Widerspruch besteht. Durch Induktion der Tryptophan-Dioxygenase wird eine Eröffnung des Kynureninweges erwartet (23). Der limitierende Faktor soll nach Knox (22) die Vitamin B₆ abhängige Kynureninase-Reaktion sein, so daß Metaboliten vor dieser Reaktion vermehrt auftreten. Befunde aus Leberperfusionsversuchen hingegen besagen ein vermehrtes Auftreten von Chinolinsäure. Nach Lardy et al. (29, 110, 111) steigt die meßbare PEP-CK-Aktivität, es unterbleibt aber eine Glukoneogenese aus Pyruvat, Malat und Aspartat in vivo. Für diese Hemmung soll die Chinolinsäure maßgeblich verantwortlich sein (112-117). Sie aber ist ein Metabolit, der erst nach der Kynureninase-Reaktion auftritt.

3.2. Versuchsbeschreibung

(methodische Einzelheiten im experimentellen Teil)

Zur Durchführung der Versuche wurden 12stündige Urinproben von gehungerten Ratten gesammelt. Um Einflüsse eines schwankenden Östrogenspiegels zu vermeiden (24-28), wurden männliche Tiere verwendet. Neben einem Tryptophanbelastungsversuch wurde zur Untersuchung des Hydrocortisoneinflusses den Tieren zum Zeitpunkt 0 Hydrocortison verabreicht. Tryptophan wurde zusätzlich nach 0, 2, 3, 4 oder 5 Stunden gegeben.

3.3. Ergebnisse (Abb. 6)

Die Aufarbeitung erfolgte gemäß den oben beschriebenen Schritten. Man findet nach Tryptophanbelastung, daß die Ausscheidung von Tryptophan und Kynurensäure nicht wesentlich erhöht ist. Auch die Chinolinsäure wird geringfügig vermehrt gefunden.

Bei gleichzeitigen Tryptophan- und Hydrocortisongaben fällt die Ausscheidung von Tryptophan und Kynurensäure ab, Chinolinsäure wird vermehrt gefunden. Gibt man Tryptophan zwei Stunden nach Cortisolgabe, findet man einen Anstieg der ausgeschiedenen Mengen von Tryptophan und Kynurensäure, dagegen zuerst unveränderte Mengen der ausgeschiedenen Chinolinsäure. Einen weiteren

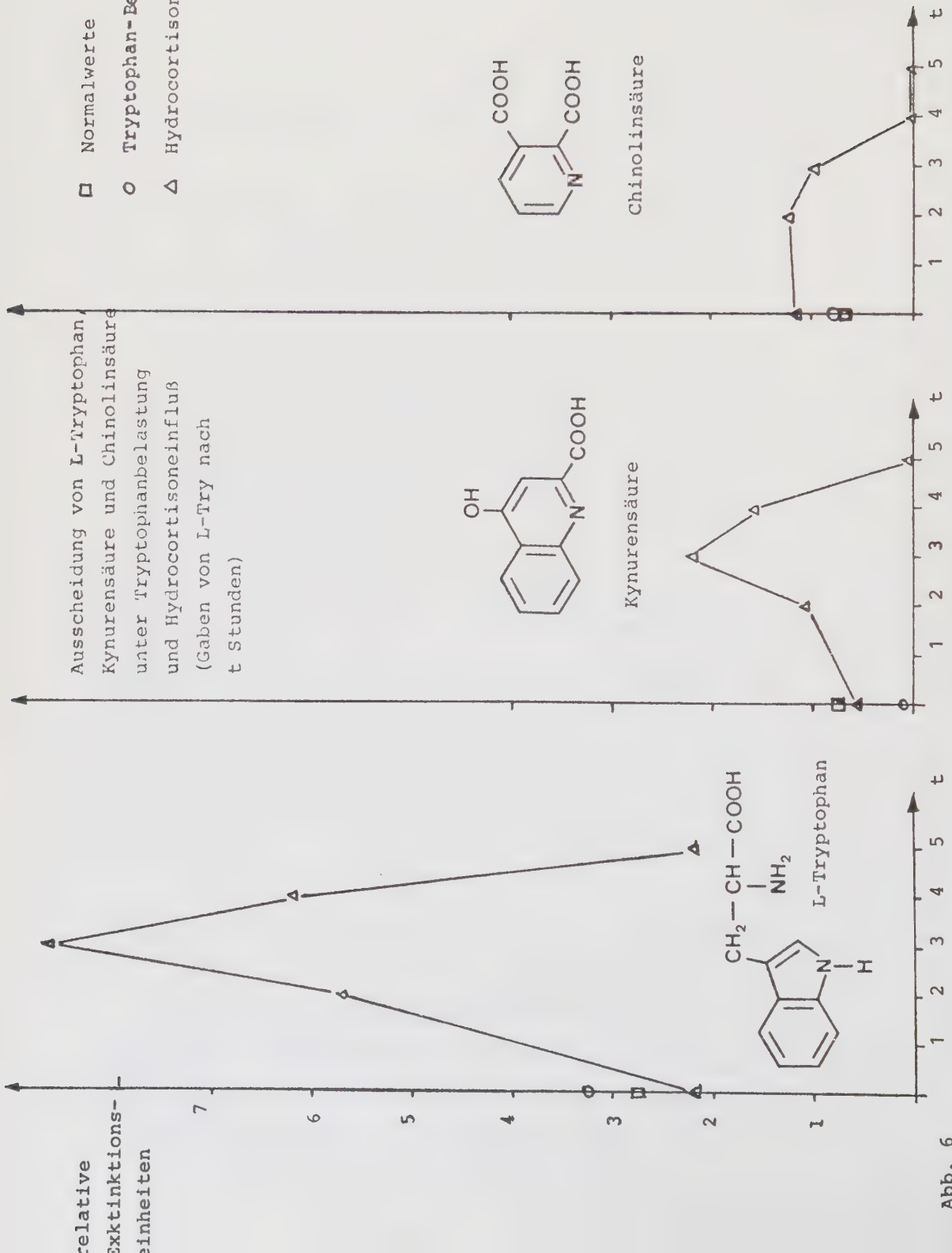


Abb. 6

Anstieg der ausgeschiedenen Mengen von Tryptophan und Kynurensäure bei abfallenden Mengen an Chinolinsäure beobachtet man bei Tryptophangaben drei Stunden nach Cortisol. Nach vier bis fünf Stunden fällt die Ausscheidung von Tryptophan stark ab, während die Chinolinsäure nur noch in ganz geringen Mengen gefunden wird.

3.4. Diskussion

Diese Ergebnisse zeigen zunächst eine gute Übereinstimmung mit Altman und Greengard (23); nach Hydrocortisoninduktion der Tryptophan-Dioxygenase wird vermehrt Tryptophan in den Kynureninweg eingeschleust. So findet man weniger Tryptophan und Kynurensäure als Ausscheidungsprodukte. Man ersieht weiter, daß anfänglich nach Tryptophan-Dioxygenase-Induktion durch Tryptophan selbst oder Hydrocortison vermehrt Chinolinsäure ausgeschieden wird. Das bestätigt die mit der Leberperfusionstechnik durchgeführten Versuche; eine Hemmung der PEP-CK-Aktivität kann somit - zumindest anfänglich - auch in vivo erfolgen.

Im weiteren Verlauf der Induktion durch Hydrocortison, die eine vermehrte Neubildung von Enzym darstellt, fällt aber die ausgeschiedene Menge an Chinolinsäure ab. Aus der vermehrten Menge des gefundenen Tryptophans und Kynurensäure bei Belastung nach zwei bis drei Stunden läßt sich der Engpaß der Vitamin-B₆ abhängigen Kynureninase-Reaktion ableiten, wie dies bei Knox (22)

und Altman (23) beschrieben ist.

Bei Leberperfusionen wurde aufgezeigt, daß die Tryptophan-Dioxygenase vier bis fünf Stunden nach Hydrocortisoninduktion ihre maximale Aktivität erreicht (118). Da gleiche Versuche am Ganztier bisher nicht beschrieben waren, wurde das Substrat in diesem Zeitraum zu den verschiedenen Zeitpunkten angeboten. Wir erwarteten entsprechend die maximale Metabolitenfindung - hier entweder Tryptophan und Kynurensäure oder Chinolinsäure - bei Gaben des Tryptophans nach vier bis fünf Stunden nach der Induktion mit Hydrocortison. Dies aber war nicht der Fall. Alle drei Ausscheidungsprodukte wurden zu diesen Zeitpunkten nur in geringer Konzentration gefunden. Eine Erklärung mag in einer in vivo einsetzenden Gegenregulation liegen, die auf verschiedene Weise erfolgen kann (vergl. Abb. 2) und zu hochinteressanten weiteren Untersuchungen anregt.

1) Tryptophan geht vermehrt in den Serotonin-Weg

Morris et al. (119) fanden nach Tryptophanbelastung keine Änderung der relativen prozentualen Verteilung der Metabolite im Kynurenin- und Serotonin-Abbauweg. Sie ziehen daraus den Schluß, daß weniger das Enzymangebot als das Substratangebot für die in vivo Regulation von Bedeutung ist. Dieser Befund wurde nach Tryptophanbelastung gemacht, er muß aber nicht bei Hydrocortisonwirkung zutreffen.

2) Tryptophan wird vermehrt in Proteine eingebaut. Für diese Befunde spricht die nach Hydrocortisongaben vermehrt auftretende RNS, die ja ein Indiz für eine vermehrte Proteinsynthese ist. Weiter besagen Befunde von Frieden et al. (120) und Wagner (121), daß Indolabkömmlinge, Metabolite aus dem oxydativen Abbau des Tryptophans, das NAD selbst sowie seine Vorstufen einen hemmenden Einfluß auf die Tryptophan-Dioxygenase-Aktivität besitzen. Das kann bedeuten, daß Tryptophan vermehrt für die Proteinbiosynthese zur Verfügung steht oder auf anderen Wegen metabolisiert wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit eines retardierten Abbaus oder einer verminderten Resorption.

3) Tryptophan wird vermehrt durch den Kynureninweg bis hin in den Zitronensäurezyklus oder zur NAD-Synthese geschleust. Diese These steht in gewissem Widerspruch zur obigen Annahme und wäre an der NAD- sowie der CO_2 -Ausscheidung zu überprüfen. Eine Einschränkung der Wahrscheinlichkeit dieses Weges ist durch Befunde gegeben, die unter Tryptophanbelastung im Humanurin mitunter eine geringere Menge an ausgeschiedenem Nikotinsäureamid berichten (7). Hier gilt ebenfalls der Hinweis, daß nicht gleiche Bedingungen, nämlich Hydrocortisoneinfluß, vorliegen.

Zur Klärung der unter diesen Bedingungen gefundenen Effekte sind weitere Untersuchungen in Vorbereitung.

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die Untersuchung des Tryptophanstoffwechsels wird ein Verfahren beschrieben, Tryptophan-5- ^{14}C zu synthetisieren. Als Ausgangsmaterial zur Markierung wird Natrium- bzw. Kaliumcyanid- ^{14}C oder Bariumcarbonat- ^{14}C eingesetzt. Bei den untersuchten Synthesewegen wird zuerst ein in 4-Position markiertes Toluol hergestellt, das nicht käuflich ist. Ausgangssubstanz (siehe Syntheschema) für diese Synthese ist 3-Methyl-1,5-dibrompentan. Unter den möglichen Präparationswegen erweist sich die Umsetzung der Dibromverbindung zum Dinitril mit anschließender Verseifung zur 4-Methylpimelinsäure als der mit der besten Ausbeute. Nach Veresterung dieser Dicarbonsäure und Ringschluß nach Dieckmann gelangt man zum 4-Methylcyclohexanon. Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid führt zum 4-Methylcyclohexanol; Dehydratisierung und allylische Dibromierung des entstandenen 4-Methylcyclohexens mit folgender Dehydrobromierung führt zum Toluol. Weitere untersuchte Wege sind die Umsetzung der Grignardverbindung des 3-Methyl-1,5-dibrompentans mit Kohlendioxid- ^{14}C oder Ameisensäureäthylester- ^{14}C (durch Reduktion mit $\text{NaBH}(\text{OCH}_3)_3$ aus Kohlendioxid) zum 4-Methylcyclohexanon bzw. 4-Methylcyclohexanol. Setzt man stattdessen die dilithiierte Verbindung mit Kohlendioxid um, gelangt man wie bei der über das Nitril gehenden Synthese, allerdings mit schlechteren Ausbeuten, zur 4-Methyl-

pimelinsäure.

Nach Oxidation des Toluols zu Benzoessäure und Schmidt-Umlagerung zum Anilin wird daraus Phenylhydrazin hergestellt. Kondensation mit 4-Acetamino-4,4-dicarboxäthoxybutyraldehyd (aus Malonsäurediäthylester herzustellen) ergibt das zur Fischer'schen Indolsynthese benötigte Phenylhydrazon. Indolisierung, Verseifung zum 1-Acetamino-1,1-dicarboxy-2-(3-indolyl)-äthan und Decarboxylierung ergibt N-Acetyltryptophan-5-¹⁴C, das schließlich einer Racematspaltung unterworfen wird.

Weiter werden gebräuchliche Analysemethoden zur Analytik von Tryptophanmetaboliten unter besonderer Berücksichtigung der Erfassung in physiologischen Flüssigkeiten untersucht. Es gelingt, nach drei einfachen Extraktionsschritten bei pH 10-11, pH 3-5 und nach Einengen zur Trockne aus dem Kristallisat schnell eine qualitative und quantitative Auswertung einer Vielzahl von Tryptophanmetaboliten zu erreichen. Für die Chromatographieläufe werden 13 Fließmittelsysteme und die R_F -Werte von 17 Tryptophanmetaboliten angeführt. Die Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen Substanzen wird erfolgreich mit Hilfe der optischen Remissionsmethode direkt auf der Dünnschichtplatte ("in situ"-Verfahren) durchgeführt.

Am Ganztierversuch wird eine Anwendung exemplarisch auf drei im folgenden Zusammenhang aussagekräftige Metabolite unter Tryptophanbelastung sowie Gaben von Hydrocortison

durchgeführt. Ausgangspunkt für diese Untersuchungen war der von Lardy et al. (29) beschriebene "paradoxe Tryptophaneffekt", der nach Hydrocortisongaben eine gesteigerte Aktivität sowohl der Tryptophan-Dioxygenase als auch der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-CK), dem Schlüsselenzym für die Gluconeogenese, feststellt. Bei Leberperfusionsversuchen konnte jedoch keine Gluconeogenese festgestellt werden. Dies wird der unter diesen Bedingungen wahrscheinlich vermehrt auftretenden Chinolinsäure aus dem Tryptophanmetabolismus zugeschrieben, die das in der PEP-CK vorhandene Eisen komplexieren soll. Falls in vivo ein gleicher Mechanismus vorliegt, sollte unter den oben beschriebenen Bedingungen auch eine vermehrte Ausscheidung im Urin erfolgen. Es wird gefunden, daß das nicht zutrifft. Aufgezeigt wird der Einfluß auf die Verteilung von Tryptophan, Kynurensäure und Chinolinsäure im Urin. Es wird beobachtet, daß eine anfängliche Eröffnung des Kynureninweges in vivo einer bisher nicht beschriebenen Gegenregulation unterliegt. Mögliche Wege einer solchen Regulation werden erörtert.

Nach diesen grundlegenden Untersuchungen ist es nunmehr möglich, auch mit Tracerdosen an Tryptophan und somit geringer Substratbelastung eine Vielzahl von Metaboliten zu analysieren. Die Analysemethodik ermöglicht die verschiedensten Tryptophanmetaboliten zu erfassen, selbst geringste Mengen können nunmehr mit Hilfe ihres R_f -

Wertes autoradiographisch auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen werden. Die gefundenen Ergebnisse im Tierversuch geben begründeten Anlaß zu weiterführenden, erfolgversprechenden Experimenten.

V Experimenteller Teil

1. Arbeitsvorschriften zur Synthese

Die verwendeten Chemikalien waren vom höchsten erhaltlichen Reinheitsgrad und wurden, falls nötig, nach den üblichen Methoden gereinigt (127).

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert und wurden entweder mit einem Heiztischmikroskop oder in einem Schmelzpunktapparat nach Dr. Tottoli im offenen Röhrchen bestimmt.

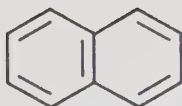
Die Szintillationsmessungen der radioaktiven Proben wurden im Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Modell 3380 oder 2405 vorgenommen.

Zur Aufnahme von VIS-UV-Spektren dienten die Spectrophotometer DB-GT, ActaTM III und ActaTM v der Firma Beckman.

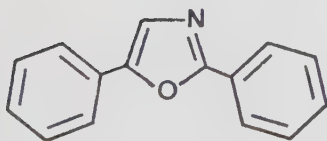
Zur Fraktionierung von Säuleneluaten diente der LKB-Ultrorac Fraktionssammler mit Uvicord II Ultraviolet Absorptiometer.

Szintillationslösung

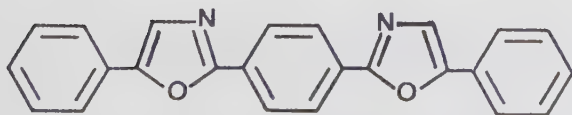
130 mg POPOP (2,2'-p-Phenylene-bis(5-phenyloxazol)) werden in 500 ml Toluol gelöst. Dazu werden 6,5 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) gegeben, anschließend 104 g Naphthalin. Die Lösung wird mit 500 ml Dioxan, dann mit 300 ml Methanol versetzt.



Naphthalin



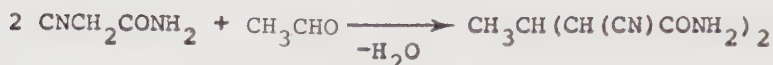
2,5-Diphenyloxazol (PPO)



2,2'-p-Phenylene-bis(5-phenyloxazol) (POPOP)

Darstellung von β -Methylglutarsäure

a) Darstellung von α,α' -Dicyano- β -methylglutaramid



84,08



44,05



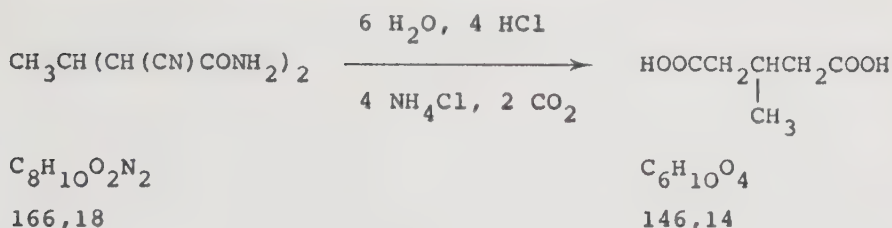
166,18

Gereinigtes Cyanacetamid (52 g, 0,62 mol) in 340 ml Wasser wird in einem 1 l Kolben auf 10°C gekühlt und unter Rühren nacheinander mit 13,75 g (0,31 mol) frisch destilliertem Acetaldehyd und 20 ml Piperidin versetzt. Nach zweistündigem Stehen bei Raumtemperatur wird die Lösung unter Schütteln in einem Eis-Salz-Gemisch teilweise gefroren. Nach ungefähr 30 Minuten beginnt das Produkt auszukristallisieren. Nach 1 Stunde wird auf Raumtemperatur gebracht und der Niederschlag abfiltriert; Nach Waschen mit kaltem destilliertem Wasser erhält man

Ausb.: 41,8 g (0,25 mol, 80,6%) Schmp : 155-157 °C;

Lit.: 71 %, Schmp.: 160-161 °C (39)

b) Darstellung von β -Methylglutarsäure



In einem 500 ml Kolben werden 40 g (0,24 mol) des Amids in 100 ml konzentrierter Salzsäure unter leichtem Erwärmen gelöst. Es wird mit 100 ml Wasser verdünnt und 8 Stunden unter Rückfluß gekocht. Danach wird die Lösung mit NaCl gesättigt und fünf Mal mit je 60 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinten Extrakte werden über P_4O_{10} getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel verdampft. Umkristallisieren aus 25 ml 10 %iger Salzsäure ergibt

Ausb.: 23,1 g (0,16 mol, 65,8 %) Schmp.: 84-85 °C

Lit.: 71,1 %, Schmp.: 85-86 °C (39)

Darstellung von 3-Methylpentan-1,5-disäurediäthylester

3-Methylglutarsäure wird mit absolutem Äthanol in trockenem Benzol unter den üblichen Bedingungen verestert.

Ausb.: 80-85 %, Sdp.: 117-122 °C (13-16 Torr)

Lit.: 82,9 %, Sdp.: 121-122 °C (16 Torr) (129)

Darstellung von 3-Methyl-1,5-pentandiol

Der obige Ester wird mit LiAlH_4 zu 3-Methyl-1,5-pentandiol reduziert.

Ausb.: 80 %, Sdp.: 143-146 °C (13-15 Torr)

Lit.: Sdp. 145,5-146 (15 Torr) (41)

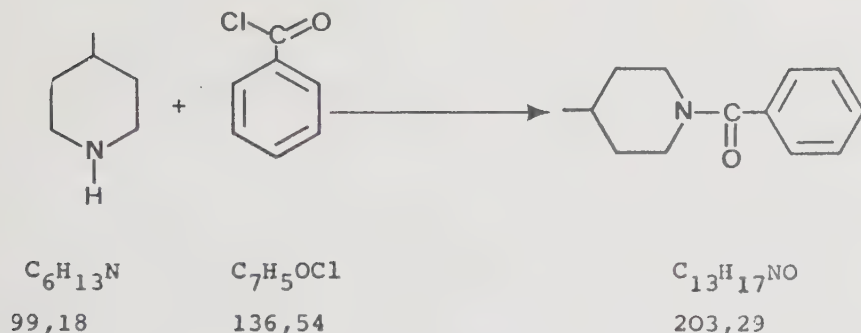
Darstellung von 3-Methyl-1,5-dibrompentan

Durch Umsetzung auf dem üblichen Weg erhält man aus dem Diol mit 48 %iger HBr und H_2SO_4 conc. das Produkt.

Ausb.: 83 %, Sdp.: 100-102 °C (10-12 Torr)

Lit.: 114-115 °C (17 Torr) (41)

Darstellung von 1-Benzoyl-4-methylpiperidin

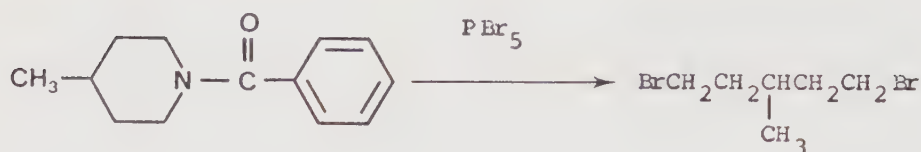


Zu einer Lösung von 121,4 g (1,22 mol) 4-Methylpiperidin und 64,3 g (1,6 mol) Natriumhydroxid in 500 ml Wasser werden innerhalb einer Stunde unter intensivem Rühren 170 g (1,25 mol) Benzoylchlorid in einem thermostatisierten Reaktionsgefäß bei 35 °C zugetropft. Der ausfallende Niederschlag wird abfiltriert, die wässrige Phase zweimal mit je 100 ml Diäthyläther ausgeschüttelt. Die vereinten Ätherextrakte werden zur Trockne eingengt. Nach Lösen der erhaltenen Produkte in siedendem Äthanol wird gerade soviel Wasser zugegeben, bis die erste Trübung auftritt. Nach Abkühlen wird der Niederschlag filtriert und über $CaCl_2$ im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

Ausb.: 238 g (1,17 mol, 96 %) Schmp.: 83-84 °C

Lit.: 92 %, Schmp.: 83,5-84 °C (42)

Darstellung von 1,5-Dibrom-3-methylpentan



$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}$

203,29

270,7

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{Br}_2$

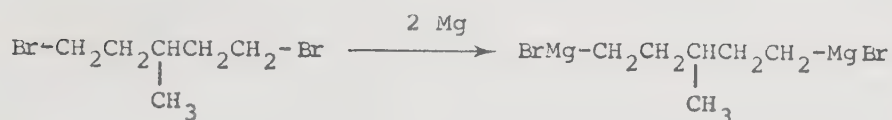
243,98

Unter Kühlen und Rühren werden 286 g (1,06 mol) Phosphortribromid, anschließend 55 ml (171,5 g, 1,07 mol) Brom zu 212 g (1,04 mol) 1-Benzoyl-4-methylpiperidin getropft. Das Reaktionsgemisch wird anschließend im Vakuum destilliert. Hierbei ist darauf zu achten, daß die Temperatur 150°C nicht überschreitet und die Schmelze gut gerührt wird.

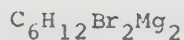
Das Destillat wird auf zerstoßenes Eis gegossen und anschließend mehrere Stunden gerührt. Die organische Schicht wird abgetrennt und mit 325 ml 40%iger HBr unter Rückfluß gekocht. Nach Wasserdampfdestillation wird die organische Schicht abgetrennt, zweimal mit 10%iger Natriumcarbonatlösung, anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird redestilliert.

Ausb.: 140,4 g (0,58 mol, 55,3%); Sdp.: 85-87 °C (0,05 Torr);
 n_D^{20} : 1,508 (100-102 °C (10-12 Torr))
 Lit.: 65 %; n_D^{20} : 1,5073 (42)
 Sdp.: 114-115 °C (17 Torr) (41)
 100-102 °C (10-12 Torr) (40)

Darstellung von 3-Methylpentyl-1,5-di(magnesiumbromid)
(Reaktion nach Grignard)



243,29

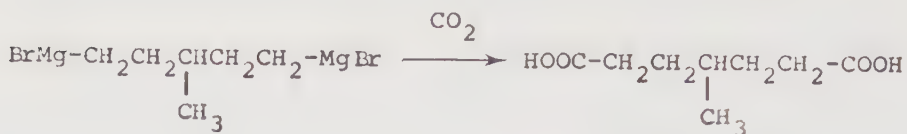


24,3

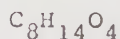
220,5

1 mol Magnesiumspäne mit 100 ml absolutem Diäthyläther oder Tetrahydrofuran übergossen werden mit 1/20 von insgesamt 0,5 mol Alkyldihalogenid unter Rühren versetzt. Springt die Reaktion nicht an, wird durch Zugabe von 0,5 ml Brom, einigen Tropfen Tetrachlorkohlenstoff, Methyljodid oder einem Kristall Jod die Reaktion in Gang gesetzt. Nach dem Anspringen wird das restliche Alkyldihalogenid, gelöst in 125 ml des entsprechenden Äthers, zugetropft. Gegen Ende der Reaktion wird eine Stunde zum Sieden erhitzt.

Umsetzung der Digrignardverbindung mit Kohlendioxid



220,5



174,2

In die auf -5°C gekühlte Lösung wird ein kräftiger Strom Kohlendioxids so eingeleitet, daß die Temperatur 0°C nicht übersteigt. Wird keine exotherme Reaktion mehr beobachtet, leitet man noch eine weitere Stunde Kohlendioxid ein, zersetzt dann durch Zugabe von 50 g zerstoßenem Eis und gibt so viel halbkonzentrierte Salzsäure zu, daß sich der entstandene Niederschlag löst, trocknet die abgetrennte ätherische Phase mit Magnesiumchlorid und entfernt das Lösungsmittel. Der Rückstand wird aus heißem Wasser unter Zugabe von etwas Salzsäure umkristallisiert.

Ausb.: 30 - 50 % Dicarbonsäure, Schmp.: $53 - 55^\circ\text{C}$

Lit.: Schmp. $56 - 57^\circ\text{C}$ aus Äther (Beil. 2, H696, I287, III1772)

Will man das gleichzeitig entstehende Keton isolieren, wird die abgetrennte ätherische Phase mit 1 n NaOH geschüttelt und anschließend fraktioniert destilliert. Die Dicarbonsäure gewinnt man durch Ausäthern der angesäuerten wässrigen Phase.

Ausb.: 10-20 % 1-Methylcyclohexan-4-on, Sdp.: $58-61^\circ\text{C}$ (17 Torr)

Lit.: Sdp. $60,5^\circ\text{C}$ (16,8 Torr) (Beil. 7, H 18, I 13, II 19, III 63)

Darstellung von Natriumtrimethoxyborhydrid



24,0 103,9

127,9

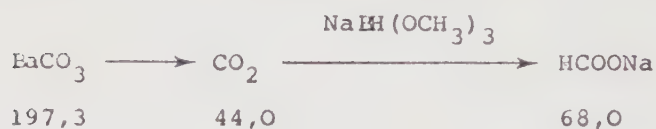
Natriumhydrid (48 g, 2 mol) werden in einen mit Stickstoff gespülten Kolben eingetragen. 230 g (2,2 mol) Trimethoxyborat werden langsam zugetropft. Danach wird vorsichtig auf Rückflußtemperatur erwärmt (68 °C) und vier bis fünf Stunden gerührt. Anschließend wird das überschüssige Trimethylborat abdestilliert, letztlich durch Vakuumdestillation.

Ausb.: 256 g (2 mol, quantitativ); aus Isopropylamin

Schmp.: 230 °C (Zers.)

Lit.: Schmp.: 230 °C (Zers.) (44)

Darstellung von Ameisensäure aus Bariumcarbonat



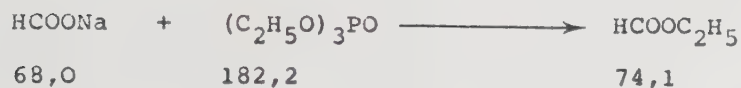
Ein trockener 100 ml Kolben wird evakuiert und mit Helium gefüllt. 0,77 g (6 mmol) Natriumtrimethoxyborhydrid werden rasch in den Kolben gegeben. Nach Evakuierung des Kolbens und Kühlung in flüssigem Stickstoff werden 3 mmol Kohlendioxid, entwickelt aus 0,592 g (3 mmol) Bariumcarbonat mit 0,5 g (4,9 mmol) konzentrierter Schwefelsäure (95-97 %) und eingefroren mit flüssigem Stickstoff, durch Vakuumdestillation übergeführt. Der Kolben wird verschlossen und eine Woche bei Raumtemperatur stehengelassen.

Nach erneutem Anschluß an das Vakuum-System wird der Kolben wieder mit flüssigem Stickstoff gekühlt und fünf Minuten evakuiert. Dann wird weiter unter Vakuum auf Raumtemperatur gebracht. Nach Öffnen des Kolbens werden 10 ml Wasser zur Zersetzung des überschüssigen Hydrids auf einmal hinzugegeben. Nach Überführen der alkalischen Lösung in eine Wasserdampfdestillationsapparatur und Ansäuern mit 5 ml 6 n Schwefelsäure wird das Produkt durch Destillation gereinigt. Das Destillat wird laufend mit 0,1 n Natriumhydroxidlösung gegen Phenolphthalein neutralisiert. Die neutralisierte Natriumformiatlösung wird anschließend zur Trockne eingengt.

Ausb.: 0,16 g (2,4 mmol, 78,4 %); Schmp.: 250-251 °C

Lit.: 80 - 90 %, Schmp.: 251-253 °C (Beil. 2, H14, I13, II19, III22)

Darstellung von Ameisensäureäthylester aus Natriumformiat
mit Triäthylphosphat

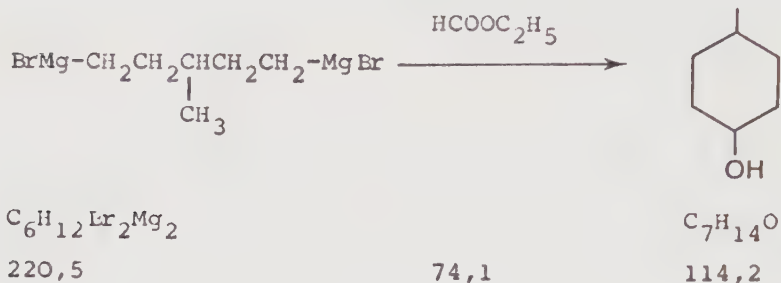


17 g (0,25 mol) Natriumformiat werden mit 45,5 g (0,25 mol)
Triäthylphosphat 1,5 Stunden unter Rückfluß erhitzt.

Ausb.: 75-90 %; Sdp.: 53-54 °C

Lit.: Sdp. 54,15 °C (Beil. 2, H19, I16, II26, III31)

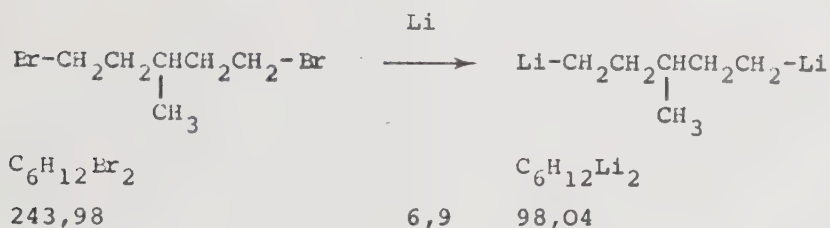
Umsetzung der Digrignardverbindung mit Ameisensäureäthylester



In die Grignardlösung aus 0,5 mol Alkyldihalogenid tropft man unter Rühren 0,5 mol Ameisensäureäthylester in 200 ml des entsprechenden Äthers ein. Nach beendeter Zugabe und zweistündigem Kochen unter Rückfluß, zersetzt man die abgekühlte Lösung mit 50 g zerstoßenem Eis, löst den Niederschlag mit 50 %iger Ammoniumchloridlösung und arbeitet wie üblich auf.

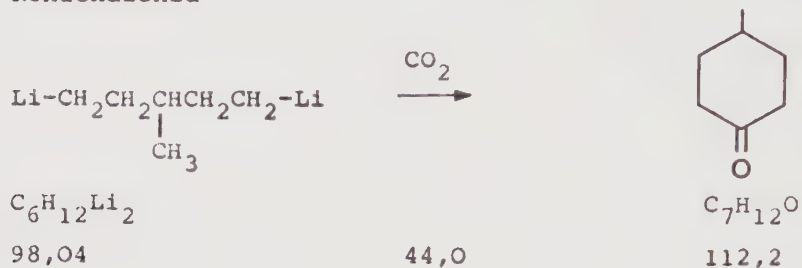
Ausb.: 17,7 g (0,15 mol, 30,9 %); Reaktion in Diäthyläther
 39,8 g (0,35 mol, 69,6 %); Reaktion in Tetrahydrofuran
 Sdp.: 172-174 °C
 Lit.: 171-173 °C (Beil. 6, H14, I10, II22, III73)

Darstellung von 3-Methylpentyl-1,5-dilithium



4,86 g (0,7 mol) Lithium werden in 150 ml Diäthyläther vorgelegt. 3 ml der ätherischen Lösung des Dibromalkans (31,7 g (0,13 mol) in 100 ml wasserfreiem Äther) werden bei 0 °C zugegeben, und durch kräftiges Rühren die Reaktion gestartet. Anschließend wird auf -10 °C abgekühlt und der Rest tropfenweise über zwei Stunden zugegeben. Dann wird eine Stunde bei 10 °C nachgerührt.

Reaktion von 3-Methylpentyl-1,5-dilithium mit
Kohlendioxid

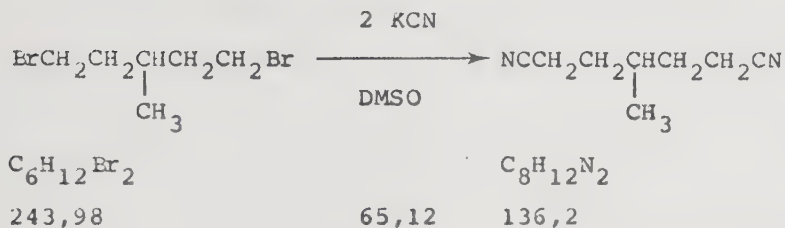


In die Lösung wird analog der Grignard-Reaktion bei -5 °C Kohlendioxid eingeleitet. Ist die Reaktion beendet, wird überschüssiges Lithium durch Zusatz von Äthanol zersetzt und die Reaktionsmischung auf Eis geschüttet. Nach Ansäuern wird die organische Phase abgetrennt, über Calciumchlorid getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Man findet als Hauptprodukt Methylcyclohexanon, als Nebenprodukte saure und polymere Substanzen.

Ausb.: 4,9 g (44 mmol, 33,6 %); Sdp.: 58-61 °C (17 Torr)

Lit.: Sdp.: 60,5 °C (16,8 Torr) (Beil. 7, H18, I13, II19, III63)

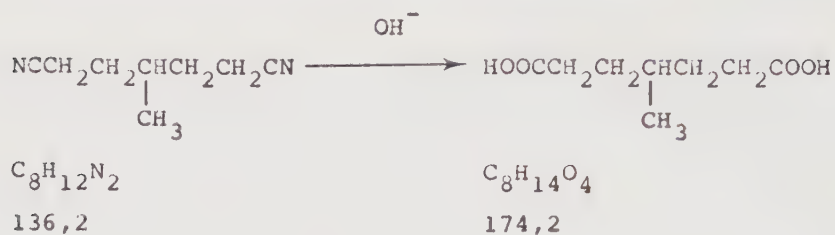
Darstellung von 1,5-Dinitrilo-3-methylpentan



Zu einer Aufschlämmung von 6,75 g (0,104 mol) Kaliumcyanid in 80 ml über Molekularsieb (4 Å) getrocknetem Dimethylsulfoxid werden bei 40 °C unter Rühren langsam (1 Tropfen/min) 12,2 g (50 mmol) 1,5-Dibrom-3-methylpentan gegeben; anschließend wird 12 Stunden nachgerührt. Das Reaktionsgemisch wird auf 100 ml Chloroform geschüttet und mit 300 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt. Es wird gerade soviel Wasser zugefügt, bis die Lösung klar ist. Nach Trennung der Phasen wird die wässrige Phase dreimal mit je 75 ml Chloroform ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen dreimal mit je 75 ml gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Chloroformphase wird über CaCl_2 getrocknet, danach das Lösungsmittel abdestilliert. Das Dinitril wird einer anschließenden Vakuumdestillation unterzogen.

Ausb.: 5,42 g (40 mmol, 79,4 %); Sdp.: 128-130 °C (0,4-0,5 Torr)

Darstellung der 4-Methyl-1,7-heptandisäure



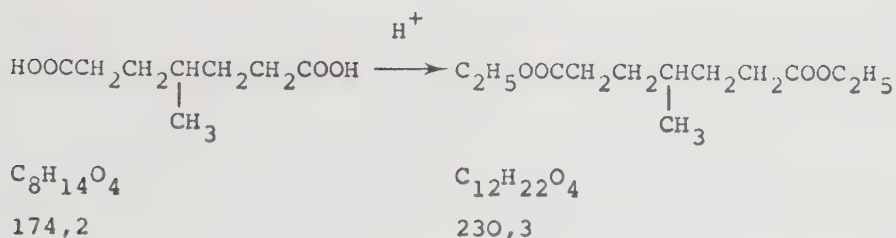
7 g (0,175 mol) Natriumhydroxid werden in 25 ml Wasser gelöst und mit 5,9 g (0,4 mol) Dinitril unter Rühren 10 Stunden unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird mit 50 ml halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert, viermal mit je 50 ml Diäthyläther ausgeschüttelt, die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels wird die Dicarbonsäure aus wässriger Salzsäure umkristallisiert.

Ausb.: 6,1 g (35 mmol, 87,5 %); Schmp.: 53-55 °C

pK aus Titration: 3,9

Lit.: Schmp. 56-57 °C aus Äther (Einhorn, Ehret; Ann. 295,185)

Darstellung des 4-Methyl-1,7-heptandisäurediäthylesters

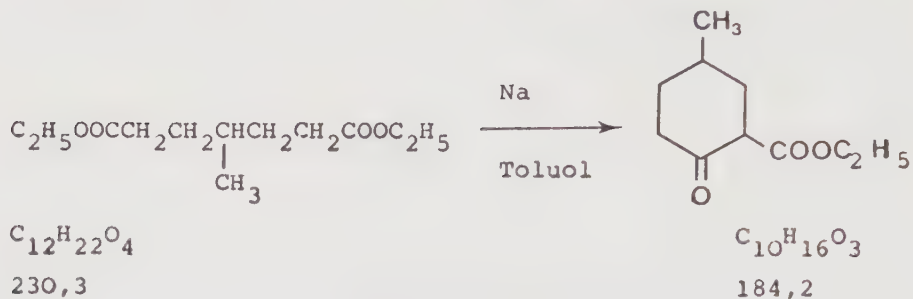


87,1 g (0,5 mol) der Dicarbonsäure und 23 g (0,5 mol) Äthanol werden mit 20,4 g (0,2 mol) konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 5 Stunden am Rückfluß gekocht. Danach wird die Hauptmenge des überschüssigen Alkohols abdestilliert und der Destillationsrückstand in die fünffache Menge Eiswasser gegossen. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase noch dreimal ausgeäthert. Nach Entsäuern der Extrakte mit konzentrierter Sodalösung wird mit Wasser neutral gewaschen, über CaCl_2 getrocknet und destilliert.

Ausb.: 79,7 g (0,35 mol, 69,2 %); Sdp.: 96-98 °C (0,25 Torr)

Lit.: Sdp. 160-167 °C (31 Torr) (Einhorn, Ehret; Ann. 295, 185)

Darstellung von 4-Methyl-2-carbonsäureäthylester-cyclohexan-1-on

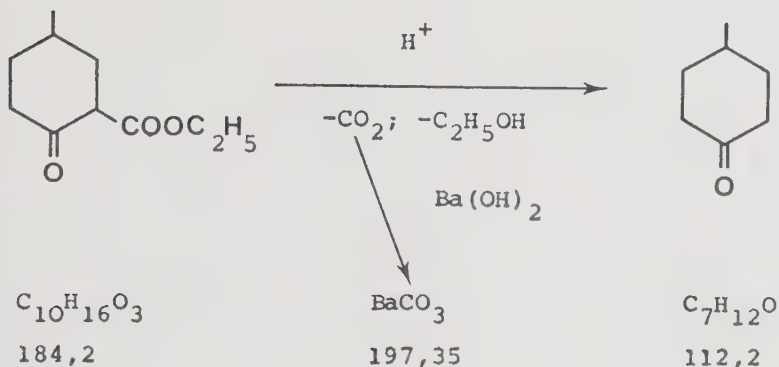


1g Natrium wird in 250 ml Toluol suspendiert. Zu der lebhaft gerührten, noch heißen Mischung werden 3,5 g (15 mmol) Diester, gelöst in 1 ml absolutem Äthanol getropft. Nach Abklingen der Reaktion wird weitere sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen wird das Gemisch auf 100 ml zerstoßenes Eis mit 2 ml Salzsäure_c gegeben. Die wäßrige Schicht wird abgetrennt, dreimal mit je 50 ml Benzol ausgeschüttelt; die vereinten organischen Phasen werden dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und nach Trocknen über Natriumsulfat destilliert.

Ausb.: 2,38 g (13 mmol, 86,2 %); Sdp.: 93-94 °C (2,5 Torr)

Lit.: Sdp. 123,5 °C (13 Torr) (Kötz, Hesse; Ann. 342, 321)

Darstellung von 4-Methylcyclohexanon-1



2,38 g (13 mmol) des cyclischen β -Ketocarbonsäureester werden mit 100 ml 20%iger HCl 5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Nach Ende der Reaktion und Abkühlen wird fünfmal mit je 50 ml Äther extrahiert, die vereinten Extrakte mit Wasser gewaschen, über CaCl_2 getrocknet und destilliert.

Ausb.: 0,88 g (7,8 mmol, 72,4 %); Sdp.: 58-61 °C (17 Torr)
 Lit.: Sdp. 60,5 °C (16,8 Torr) (Beil. 7, H18, I13, II19, III63)

Bemerkung: Bei der radioaktiven Synthese wird während der gesamten Reaktionsdauer ein N_2 -Gasstrom über das Reaktionsgemisch geleitet, der anschließend zwei Waschflaschen mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung passiert, um das bei der Reaktion frei werdende $^{14}\text{CO}_2$ zu absorbieren.

Darstellung von 4-Methylcyclohexanol-1



112,2

37,95



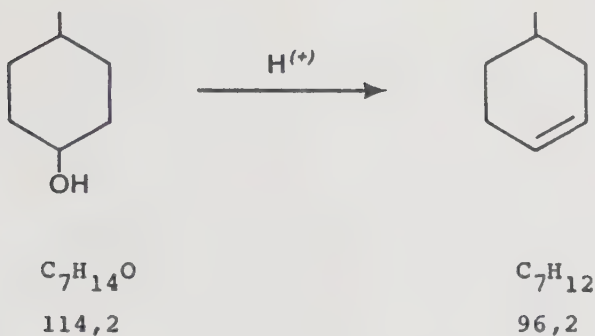
114,2

Zu 0,1 g (2,6 mmol) LiAlH_4 in 100 ml getrocknetem Äther werden 0,88 g (8 mmol) 4-Methylcyclohexanon in 25 ml Diäthyläther so zugetropft, daß das Lösungsmittel mäßig siedet. Anschließend wird eine weitere Stunde unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen auf 0°C wird die Lösung so lange mit Eiswasser versetzt, bis keine Wasserstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Es wird mit 10%iger Schwefelsäure angesäuert bis zum Lösen des Niederschlags. Nach Ausschütteln mit dreimal je 50 ml Diäthyläther werden die vereinten Extrakte mit 50 ml gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Fraktionierte Destillation ergibt

Ausb.: 0,73 g (6,4 mmol, 81,1 %); Sdp.: $171-174^\circ\text{C}$, $n_{\text{D}}^{20} = 1,456$

Lit.: Sdp. $171-173^\circ\text{C}$, n_{D}^{20} : 1,4559 (Beil. 6, H14, I10, II22, III73)

Darstellung von 4-Methylcyclohexen-1



Der sekundäre Alkohol (0,73 g, 6,4 mmol) wird mit 0,4 g 85%iger Phosphorsäure versetzt. Dieses Gemisch wird in einer Destillationsapparatur auf 140-160°C erhitzt, so daß das gebildete Olefin ständig abdestilliert. Die Vorlage wird dabei mit Eiswasser gekühlt. Das Destillat wird dreimal mit je 50 ml Äther ausgeschüttelt, die vereinten Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und fraktioniert destilliert.

Ausb.: 0,31 g (3,2 mmol, 50 %); Sdp.: 101-102 °C, $n_D^{20} = 1,441$

Lit.: Sdp. 102-103 °C (Beil. 5, H67, I34, II43, III202)
 n_D^{20} : 1,4412

Darstellung von 4-Methyl-3,6-dibromcyclohexen-1



96,2



178

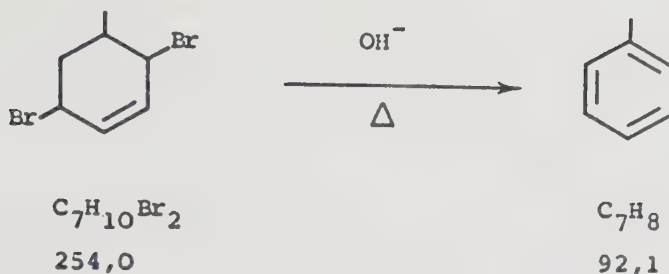


254,0

1,92 g (0,02 mol) der zu halogenierenden Substanz werden in 50 ml über P_4O_{10} getrocknetem Tetrachlorkohlenstoff gelöst, mit 8,9 g (50 mmol) getrocknetem N-Erömsuccinimid und 0,2 g Azo-bis-isobutyronitril versetzt. Nach Beendigung der Reaktion wird weitere 10 Minuten unter Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen wird das Succinimid abgesaugt, mit CCl_4 gewaschen und aus den vereinten Filtraten das Lösungsmittel abdestilliert. Anschließende Vakuumdestillation ergibt

Ausb.: 1,73 g (6,8 mmol, 34,1 %)

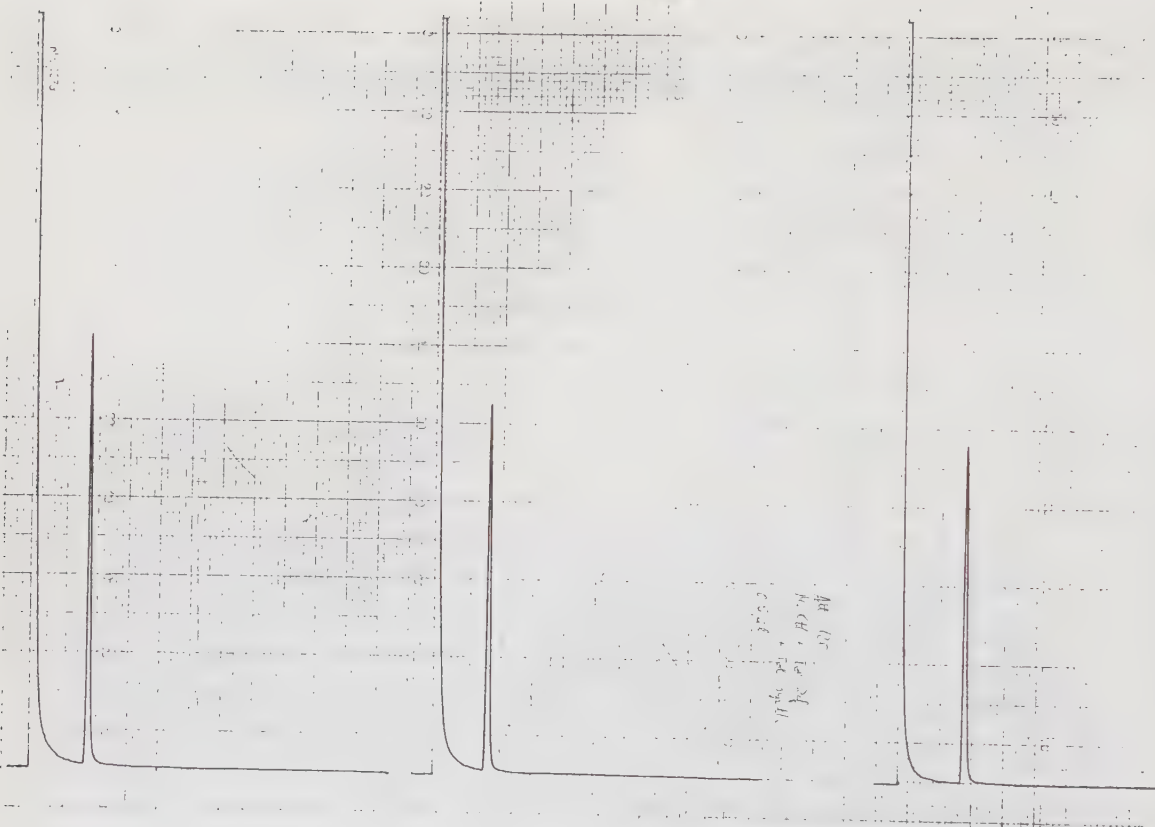
Darstellung von Toluol



2,1 g (37,5 mmol) Kaliumhydroxid in 50 ml Triglykol unter Erwärmen gelöst. Man kühlt etwas ab und gibt 1,9 g (7,5 mmol) des Alkylhalogenids zu. Danach wird langsam auf 200 °C Badtemperatur erhitzt, wobei das Eliminierungsprodukt abdestilliert. Es wird kein Innenthermometer benutzt, da durch das heiße Alkali Glas stark angegriffen wird. Die Reaktion setzt plötzlich unter Schäumen ein, daher muß langsam erwärmt werden. Das Reaktionsprodukt wird vom Wasser aus dem Lösungsmittel und Nebenreaktionen abgetrennt, die wäßrige Schicht ausgeäthert und die vereinten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird fraktioniert destilliert.

Ausb.: 0,5 g (5,4 mmol, 72,5 %); Sdp.: 107-109 °C

Lit.: Sdp. 110,6 °C (Beil. 5, H280, I144, II 209, III651)



- 1) Toluol Referenz 2) Toluol aus Synthese 3) Referenz und synth. Toluol

Gaschromatogramm des synthetisierten Toluols

- | | |
|--|----------|
| 1) Methanol/Toluol (100 + 10) | Att. 128 |
| 2) Methanol/synthetisiertes Toluol (100 + 10) | Att. 128 |
| 3) Methanol/Toluol/synthetisiertes Toluol
(100 + 10 + 10) | Att. 256 |

Packard Model 417 Becker Gaschromatograph

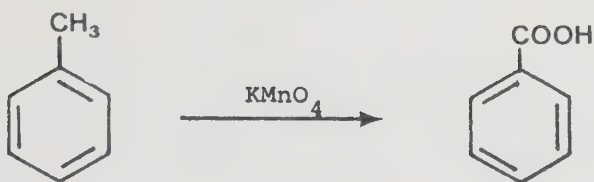
Säule: Chromosorb WHP/AWDMCS

OV 1 3%

l: 2 m, d: 2 mm

Trärgas: N₂, Temperaturprogramm: 50 - 120 °C, 7 °C/min, FID

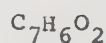
Darstellung von Benzoesäure



92,1



158,0



122,1

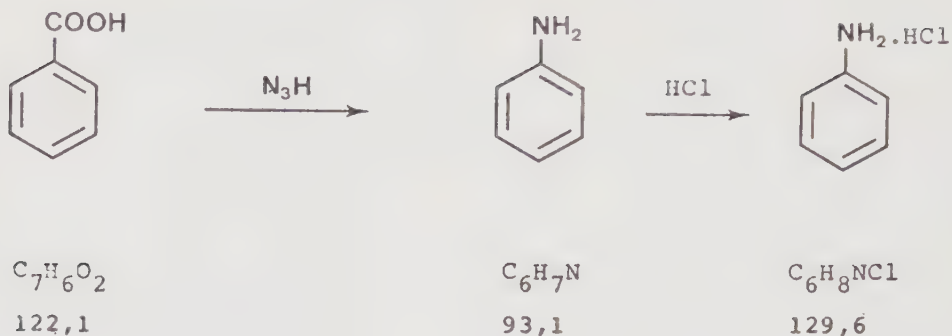
Zu einer Lösung von 1,5 g (10 mmol) Kaliumpermanganat und 0,5 g (50 mmol) Natriumcarbonat in 50 ml Wasser werden 0,5 g (5,4 mmol) Toluol gegeben und die Mischung unter Rückfluß erhitzt, bis die Permanganatfarbe verschwunden ist. Die erkaltete Lösung säuert man mit halbkonzentrierter Schwefelsäure an, löst das Mangandioxid durch Zusatz von Eisulfitlauge, saugt die ausgefallene Carbonsäure ab, äthert die wässrige Phase aus, verdampft das Lösungsmittel und kristallisiert aus Wasser um. Eine weitere Säuberung kann durch Wasserdampfdestillation der sauren wässrigen Lösung erfolgen.

Ausb.: 0,49 g (4 mmol, 73,9 %); Schmp.: 122-123 °C

keine Schmelzpunktsdepression mit Vergleichssubstanz

Lit.: Schmp.: 122,25 °C (Beil. 9, H92, I54, II72, III360)

Darstellung von Anilin

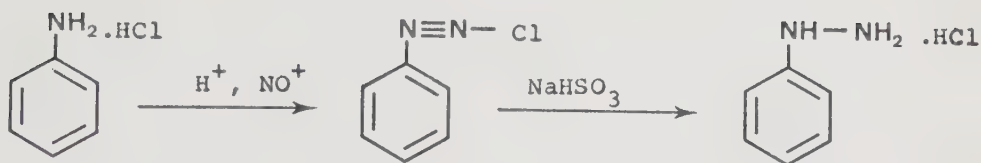


Man gibt zu einer Mischung von 0,49 g (4 mmol) Benzoesäure in 10 ml Chloroform und 2 ml konzentrierter Schwefelsäure bei Zimmertemperatur unter lebhaftem Rühren 0,33 g (5 mmol) Natriumazid in kleinen Portionen, daß die Reaktion nicht zu heftig wird. Nach Zugabe des Azids erhitzt man eine weitere Stunde unter Rühren auf 50°C. Nach Abkühlen gießt man das Reaktionsgemisch auf 20 g zerstoßenes Eis, mischt gut durch und trennt die Chloroformschicht ab. Die wäßrige Phase wird unter Kühlen mit Natronlauge stark alkalisch gemacht und das Amin mit Wasserdampf in eine Vorlage getrieben, die mit verdünnter Salzsäure beschickt ist. Daraus läßt sich das Anilinhydrochlorid durch Eindampfen im schwachen Vakuum isolieren.

Ausb.: 0,3 g (2,3 mmol, 57,7 %); Schmp.: 198-199 °C

Lit.: 197,8 °C (Beil. 12, H116, I140, II65, III232)

Darstellung von Phenylhydrazinhydrochlorid



129,6



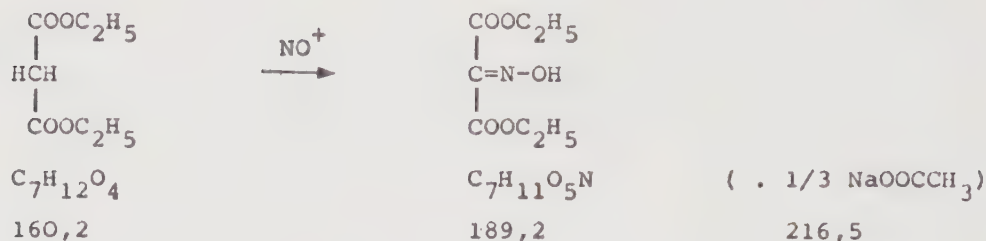
145,6

Zu 1,3 g (10 mM) Anilinhydrochlorid in 2 ml Wasser und 1,6 ml konz. Salzsäure werden nach Kühlen auf 0°C tropfenweise innerhalb von 20 min. eine Lösung von 0,72 g (10,4 mM) Natriumnitrit in 1,5 ml Wasser gegeben. Die blaßgelbe Lösung des Diazoniumsalzes wird bei 0°C auf einmal zu einer mit SO₂ gegen Phenolphthalein neutralisierten Lösung von 1,23 g Natriumhydroxid in 15 ml Wasser gegeben. Die Reaktionsmischung wird 40 min. auf 60-70°C erwärmt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 9,2 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach vier Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird das Phenylhydrazinhydrochlorid abgesaugt, über KOH, dann über Nacht über P₄O₁₀ im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

Ausb.: 1,43 g (9,8 mmol, 98 %, verunreinigt mit anorganischen Salzen), Schmp.: 193-208 °C

Lit.: Schmp. 239-240 °C (Zers.) (Beil. 15, H108, I25, II48, III7

Darstellung von Isonitrosomalonsäurediäthylester . $1/3 \text{ NaOOCCH}_3$

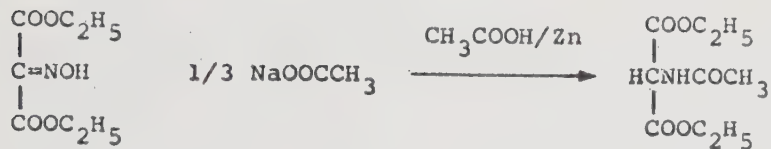


Zu 160,2 g (1 mol) frisch destilliertem Malonsäurediäthylester in 170 ml Eisessig werden bei 0 °C 207 g (3 mol) Natriumnitrit, gelöst in 250 ml Wasser, unter intensivem Rühren in einem Zeitraum von zwei bis drei Stunden getropft. Nach weiteren zehn Stunden Rühren bei Zimmertemperatur wird der entstandene Ester zunächst mit 400 ml, anschließend dreimal mit je 100 ml Methylenchlorid extrahiert. Die vereinten Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und mit 10 g festem Natriumcarbonat entsäuert. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird die Lösung filtriert, mit 20 g gepulvertem festen Natriumacetat versetzt und zehn Minuten unter Rückfluß erhitzt. Die filtrierte Lösung wird auf die Hälfte ihres Volumens eingeeengt, bis zur Trübung mit trockenem Petroläther (60/80) verdünnt und zur Kristallisation über Nacht bei 5 °C aufbewahrt.

Ausb.: 164,6 g (0,76 mol, 76,3 %); Schmp.: 88 °C

Lit.: 75 %, Schmp.: 88 °C (72)

Darstellung von Acetaminomalonsäurediäthylester



$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N} \cdot 1/3 \text{ NaOOCCH}_3$
216,5

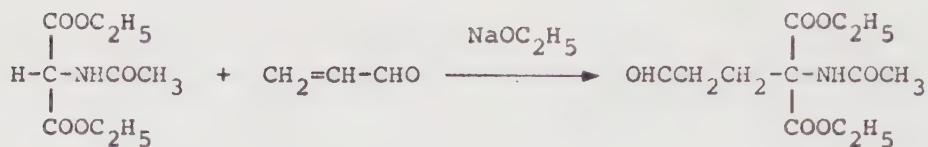
$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}$
217,2

Zu einer Lösung von 32,5 g (0,15 mol) der Additions-
verbindung in 200 ml Eisessig und 300 ml Acetanhydrid
werden bei einer Anfangstemperatur von 80 °C 80 g (1,22 mol)
Zinkstaub in solchen Portionen zugegeben, daß die Reaktions-
temperatur 110-115 °C beträgt. Danach erhitzt man weitere
30 Minuten bei dieser Temperatur. Die noch heiße Lösung
wird über eine beheizte Fritte abgesaugt und der Rückstand
zweimal mit je 70 ml siedendem Eisessig gewaschen. Das
Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand
mit Methylenchlorid ausgekocht. Der Extrakt wird erst
mit gesättigter Kochsalzlösung, dann mit Natriumcarbonat-
lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur
Trockne eingedampft. Den rohen Ester kristallisiert man
aus Isopropanol um.

Ausb.: 26,1 g (0,12 mol, 78,2 %); Schmp.: 97 °C

Lit.: Schmp.: 96-97 °C (73)

Addition von Acrolein an Acetaminomalonsäurediäthylester



217,2



56,1



273,35

Eine Mischung von 69,5 g (0,32 mol) Acetaminomalonsäurediäthylester, 0,1 g Natrium und 200 ml absolutem Äthanol wird tropfenweise bei 3 °C mit 25,9 g (0,46 mol) Acrolein innerhalb von 75 Minuten versetzt. Eine klare, gelbe Lösung resultiert nach einer weiteren Stunde Rührens. Nach 90 Minuten Nachrühren wird der Katalysator mit 0,35 g Eisessig neutralisiert. Das gesamte Volumen der Reaktionsmischung beträgt 290 ml.

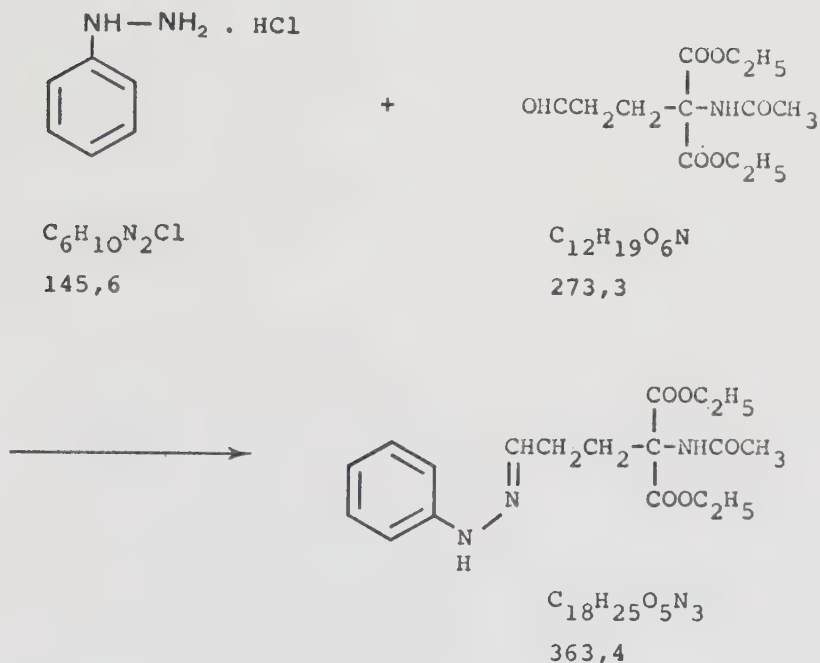
Ausb.: 90 % , bestimmt über das Phenylhydrazon

Gehalt der Lösung: 1 mmol/ml.

Schmp. des Phenylhydrazons aus Äthanol/Wasser: 138-140 °C

Lit.: Schmp. 140-141 (32)

Darstellung des Phenylhydrazons des 4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyds



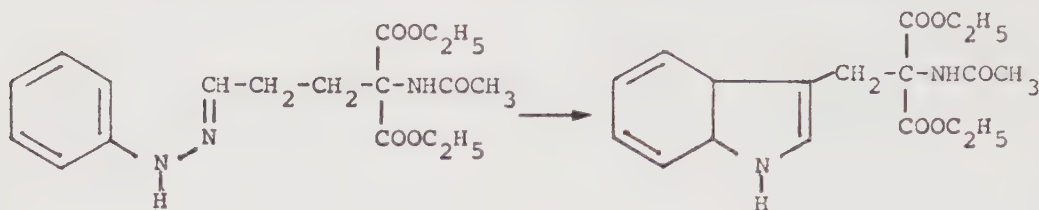
Die vereinten Kristallisate des Phenylhydrazinhydrochlorids (1,7 g, 0,012 mol, verunreinigt durch anorganische Salze) werden in 7,5 ml Wasser gelöst. Nach Zufügen einer Lösung von 0,85 g (10 mmol) Natriumacetat in 3 ml Wasser und 4,2 g (15,4 mmol) 4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxybutyraldehyd in 6 ml 50%igem Äthanol wird die Reaktionsmischung im Wasserbad 10 bis 15 Minuten auf 80°C erwärmt. Das verschlossene Gefäß wird bis zur Kristallisation des Öles geschüttelt, und nach zwei Stunden Stehen bei Raumtemperatur wird das Kristallisat abfiltriert.

Ausb.: 2,79 g (7,6 mmol, 76,9% bezogen auf Anilinhydrochlorid)

Schmp. aus Wasser/Äthanol: 140-141 °C

Schmp. 140-141 °C (22, 71)

Darstellung von 1-Acetamido-1,1-dicarbäthoxy-2-(3-indolyl)-äthan



$C_{18}H_{25}O_5N_3$

363,4

$C_{18}H_{22}O_5N_2$

346,4

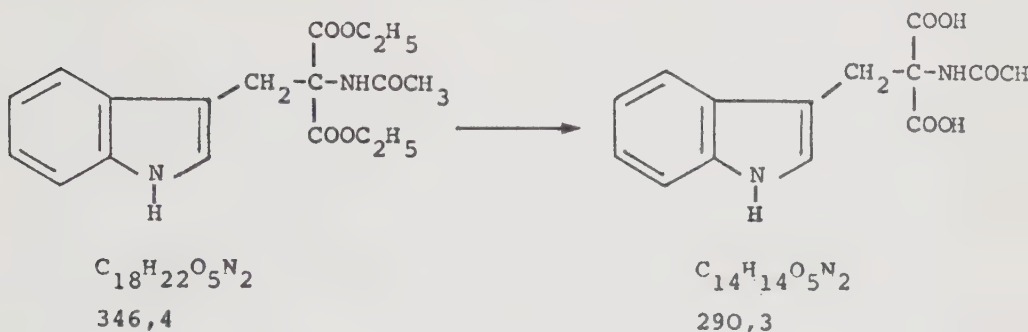
Zu 2,79 g (7,6 mmol) des Phenylhydrazons werden 16,5 ml Wasser und 2,25 ml konzentrierte Schwefelsäure gegeben. Die Mischung wird heftig gerührt und drei Stunden bei 120°C Ölbadtemperatur erhitzt. Während der Reaktion wird die Substanz erst ölig, kristallisiert aber endlich wieder. Nach Stehen über Nacht bei 5°C wird das Produkt abfiltriert und über P_4O_{10} im Vakuum-Exsikkator getrocknet.

Ausb.: 2,03 g (5,86 mmol, 76,4 %); Schmp.: 130-145 °C,

Schmp. aus Äthanol/Wasser: 156-157 °C

Lit.: Schmp. 156-157 °C (71)

Darstellung des 1-Acetamido-1,1-dicarboxy-2-(3-indoly1)-äthans



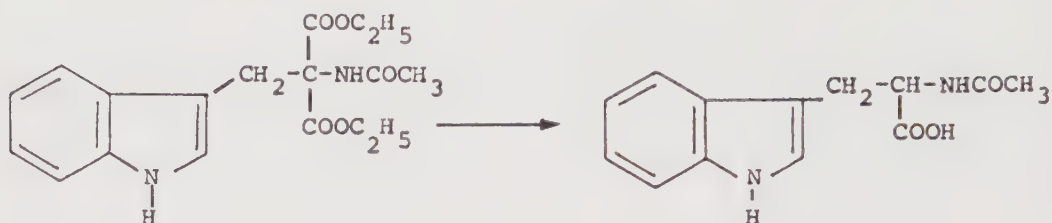
Der obige Ester (2,03 g, 5,86 mmol) wird durch Kochen mit 11,8 ml 2,5 n NaOH hydrolysiert. Die Temperatur muß schnell den Kochpunkt erreichen, weil sich die Substanz andernfalls unter Rauchen zersetzt. Nach Abkühlen auf 0°C wird mit 3 ml konzentrierter Salzsäure angesäuert, wobei die Temperatur 5°C nicht übersteigen soll. Nach weiteren fünf Stunden Stehen bei 5°C wird abfiltriert und über P₄O₁₀ getrocknet.

Ausb.: 2,07 g, verunreinigt mit anorganischen Salzen

Schmp.: 125-130°C, aus Wasser/Äthanol: 144-145 °C

Lit.: Schmp.: 144-145 °C (71)

Darstellung von N-Acetyltryptophan



346,4



246,3

Die Dicarbonsäure wird in 8 ml Wasser bei pH 4-5
2,5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Es wird auf
 0°C abgekühlt, mit einigen Tropfen konzentrierter
Salzsäure angesäuert und nach drei Stunden Stehen bei
 5°C abfiltriert.

Ausb.: 1,114 g (4,5 mmol, 79,3%); Schmp.: $190-195^\circ\text{C}$

aus Wasser/Äthanol: $207-208^\circ\text{C}$

Lit.: Schmp.: $207-208^\circ\text{C}$ (71)

Reinigung des N-Acetyltryptophans (Abb. 7)

N-Acetyltryptophan in Äthanol gelöst wird mit Hilfe
eines Rotationsverdampfers auf Kieselgel aufgezogen.
Aufgetragen auf eine Säule (4 x 70 cm, Kieselgel 60,
70-230 mesh) wird mit Chloroform/Eisessig/Methanol/
Wasser (65:20:10:5) eluiert.

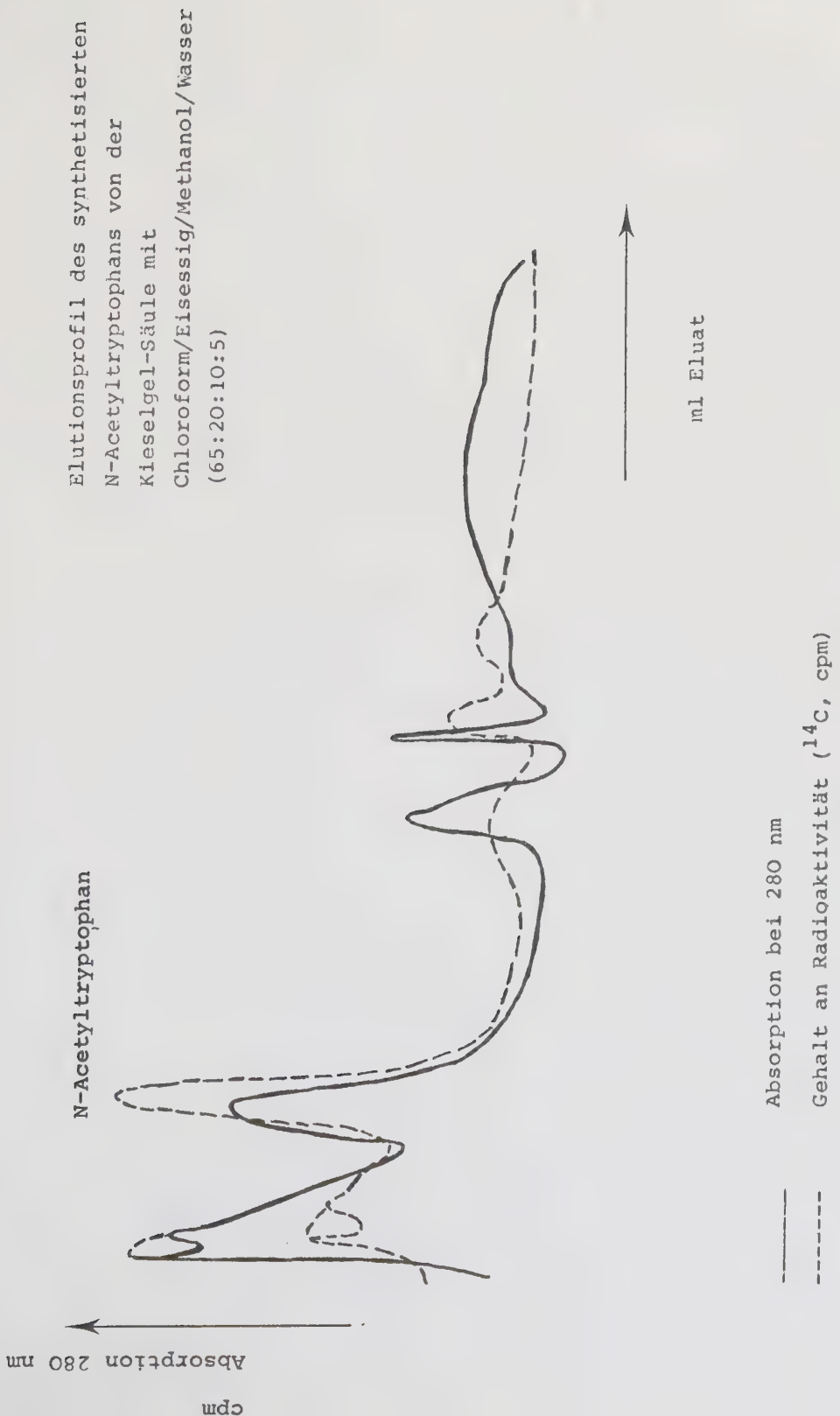


Abb. 7

Racematspaltung (127)

Acetyl-DL-Tryptophan (24,6 g, 0,1 mol) in 1 l Wasser, mit konz. Ammoniak auf pH 7,5 eingestellt, wird mit 75 mg Acylase I (Fa. Serva) bei 38°C 12 Stunden inkubiert, nach Zugabe derselben Menge Enzyms weitere acht Stunden. Die Lösung wird danach auf pH 5 gebracht, auf dem siedenden Wasserbad erhitzt, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Zugabe von Äthanol bis zu einem Gehalt von 80 % und Kühlung führt zum Niederschlag von L-Tryptophan.

Ausb.: 68 - 72 %, Schmp.: 270-290°C (Zers.)

$[\alpha]_D^{20}$: - 31,6 ° (208,1 mg in 25 ml Wasser)

Lit.: Schmp. 280-285 °C (Zers.) (Beil. 22, H546)

$[\alpha]_D^{20}$: - 31,5 ° (c = 0,5 in Wasser)

Darstellung von DL-Acetyltryptophan aus D-Tryptophan

Zu 10 g D-Tryptophan, gelöst in 100 ml N Natriumhydroxid, wird unter kräftigem Rühren in 5 ml Portionen 30 ml Essigsäureanhydrid gegeben. Während 3 Stunden bei 35-40 °C beginnen sich Kristalle zu formen. Nach Kühlen in Eis über mehrere Stunden wird abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Der Niederschlag wird in 0,2 N Salzsäure aufgeschlämmt, gekühlt, filtriert und mit kaltem Wasser chloridfrei gewaschen.

Ausb.: 9 g (75 %), Schmp.: 204 - 205 °C

aus Wasser Schmp.: 205-206 °C

Lit.: Schmp. 204 - 205 °C (9)

Ausbeuten bei
nicht markierter
Synthese

Kaliumcyanid	45,6 mCi				
1,5-Dinitrilo-3-methylpentan	36,2 mCi	87 %	79,4 %		
4-Methyl-1,7-heptandicarbonsäure	31,6 mCi	69 %	87,5 %		
4-Methyl-1,7-heptandicarbonsäurediäthylester	21,9 mCi	86 %	69,2 %		
4-Methyl-2-carbäthoxy-cyclohexan-1-on	18,8 mCi	85 %	86,2 %		
4-Methylcyclohexan-1-on	6,8 mCi	36 %	72,4 %		
4-Methylcyclohexan-1-ol	5,5 mCi	81 %	81,1 %		
4-Methylcyclohexen-1	2,7 mCi	49 %	50 %		
4-Methyl-3,6-dibromocyclohexen-1	920 µCi	34 %	34,1 %		
Toluol	650 µCi	72 %	72,5 %		
Benzoesäure	490 µCi	74 %	73,9 %		
Anilinhydrochlorid	280 µCi	57 %	57,7 %		
Phenylhydrazinhydrochlorid					
4-Acetamino-4,4-dicarbäthoxy-butyraldehyd-phenylhydrazon	200 µCi	70 %	76,9 %		
1-Acetamino-1,1-dicarbäthoxy-2-(3-indolyl)-äthan	160 µCi	80 %	76,4 %		
N-Acetyltryptophan	133 µCi	83 %	79,3 %		
N-Acetyltryptophan (nach Säulenreinigung)	45,8 µCi	34 %			
L-Tryptophan	15,4 µCi	33 % (≅66%)			
			70 %		

Bilanz einer Tryptophan Synthese aus K¹⁴CN

2. Arbeitsvorschriften zur Analytik

A) Säulenchromatographie

Sephadex QAE-A25 (Fa. Pharmacia) in der Cl^- -Form wird gewaschen und mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,9 äquilibriert. Der Ionenaustauscher wird in eine Säule mit den Abmessungen 0,94 x 100 cm (Fa. Serva) gepackt.

Carboxymethylcellulose (CMC) (Fa. Serva) in der Na^+ -Form wird ebenfalls gewaschen, mit demselben Puffer äquilibriert und in eine 0,94 x 50 cm Säule gepackt.

Die aufgebraachte Probe bestand aus

L-Tryptophan, DL-Hydroxytryptophan, L-Kynureninsulfat, Tryptaminhydrochlorid, 5-Hydroxytryptaminhydrogenoxalat, Chinolinsäure, Xanthurensäure, Indoxylsulfat und Indol. Eine Mischung dieser Substanzen (je 20 mg) wurde gelöst, indem portionsweise Äthanol, verdünnte Säure und Lauge hinzugegeben wurde. Anschließend wurde auf 250 ml mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer aufgefüllt und auf pH 7,9 eingestellt.

Eine Probe von 50 μg (0,625 ml) wird auf die Säule aufgebracht. Die Elution erfolgt von der QAE-A25-Säule mit einem komplexen NaCl-Gradienten nach Peterson und Sober (122). Die Gradientenformung erfolgt mit sieben

Gefäßen mit je 300 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,9, der 1) 0, 2) 0,01, 3) 0, 4) 0,076, 5) 0,036, 6) 0 und 7) 0,6 molar an Natriumchlorid ist. Das Eluat wird bei 280 nm mit einer Durchflußküvette registriert. Flußrate: zu Beginn 0,42 ml/min; gegen Ende 1ml/10 min. Das Eluat wird auf die CMC-Säule gelenkt, bis die basischen Substanzen adsorbiert sind. Dann folgt eine unabhängige weitere Elution der CMC-Säule mit einem linearen Gradienten aus je 300 ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer, mit 0 und 0,6 molarem NaCl-Gehalt. Flußrate: 0,45 ml/min.

Nach Elution der basischen Substanzen von der CMC-Säule wurde die Flußrate auf 1 ml/min gesteigert. Der Versuch, die Flußrate bei der QAE-A25 Säule ebenfalls zu steigern, führte nur zu einer Druckerhöhung, nicht aber zu einer Steigerung der Flußrate.

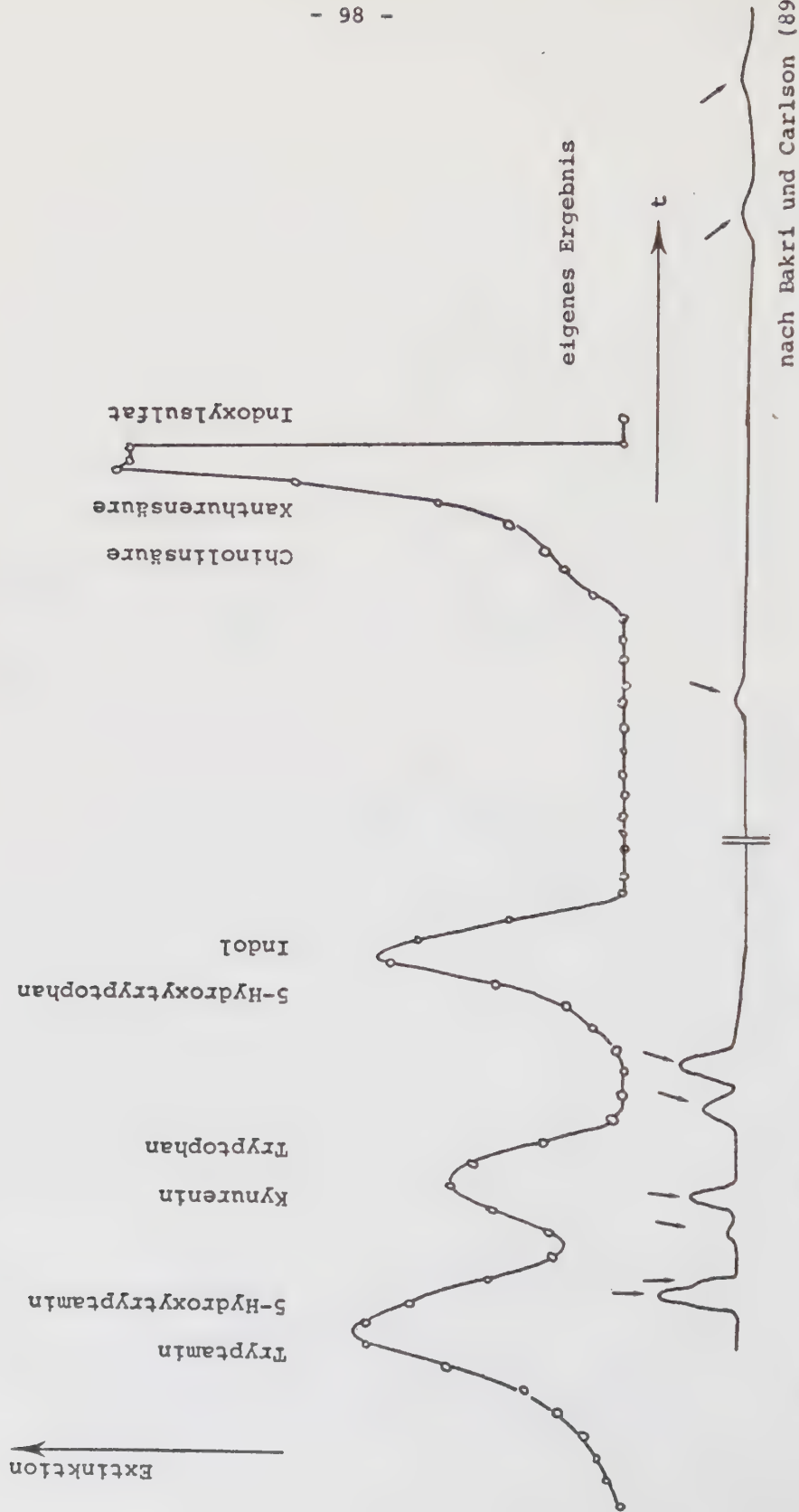


Abb. 9: Elutionsprofil eines Testgemisches mit den angegebenen Substanzen von der QAE-A 25-Säule nach eigenen Versuchen und nach Literatur (89)

B) Dünnschichtchromatographie

Die verwendeten Kammern waren von der Fa. Desaga.

Die Proben wurden punktförmig mit 10 µl Hamilton-

Spritzen, die in einen Micro-Doser (Desaga) montiert

wurden, aufgebracht. Zum Auftragen mehrerer Proben

gleichzeitig wurde teilweise das Auftragegerät

TLC-Multi-Spotter der Firma ais (Kontron) benutzt.

Wurden Proben strichförmig appliziert, geschah dies

mit Mikropipetten der Fa. Brand.

Zum Betrachten der Chromatogramme bei Wellenlängen

von 254 und 350 nm wurde die Camag-UV-Universallampe

benutzt.

Folgende Dünnschichtplatten wurden verwendet:

ICN	DC-Fertigplatten-Woelm	Kieselgel 0,25 mm
Merck	DC-Fertigplatten	Kieselgel 60F ₂₅₄ 0,25 mm
Merck	DC-Fertigplatten	Kieselgel 60F ₂₅₄ 0,5 mm
Merck	HPTLC-Fertigplatten	Kieselgel 60F ₂₅₄

Als Laufmittel fanden Lösungsmittel der Fa. Merck Verwendung,

die entweder Uvasol oder p.A. Qualität hatten und bei

Bedarf nach den üblichen Methoden weiter gereinigt

wurden.

Außer der Betrachtung unter UV-Licht wurden bisweilen

folgende Sprühreagenzien benutzt:

Ehrlich's-Reagenz (123)

1g p-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 25 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und mit 75 ml Methanol verdünnt.

Oder:

1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd wird in 100 ml Äthanol gelöst; nach Besprühen der Platte wird mit 25%iger Salzsäure entwickelt.

Nachweis von Aminen, Indolen und verwandten Substanzen

van Urk's-Reagenz

1%ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Äthanol-25% Salzsäure (1:1). Entwicklung erfolgt nach Besprühen zur Transparenz durch Überleiten von Königswaerdämpfen.

Nachweis von Indolen und Indolderivaten

Die Entwicklung der Flecken erfolgt mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Deshalb müssen die Platten mindestens 1 Woche beobachtet werden.

Prochazka's Reagenz (124)

Ein Gemisch von 10 ml Formaldehydlösung (35%), 10 ml Salzsäure (25%) und 20 ml Äthanol wird hergestellt. Entwicklung erfolgt durch Erwärmen auf 100 °C für 5 min. Die Fluoreszenzfarben im langwelligen UV lassen sich durch Überleiten von Königswasserdämpfen verstärken.

Nachweis von Indolen und Indolderivaten

Alle Farbreagenzien sind jeweils frisch zu bereiten

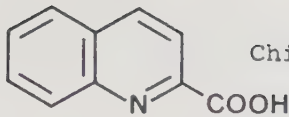
Tabelle 1

Fließmittelsysteme

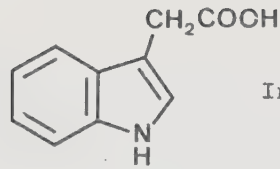
A	Aceton/2-Propanol/Wasser/Ammoniak (50:40:7:3)
B	Chloroform/Eisessig/Methanol/Wasser (65:20:10:5)
C	Dichlormethan/Äthanol/Äthylacetat (80:10:10)
D	Chloroform/Methanol/Eisessig (80:15:5)
E	n-Heptan/2-Propanol (75:25)
F	Chloroform/Methanol/Eisessig (75:20:5)
G	n-Hexan/Butanon-2 (65:35)
H	2-Propanol/Wasser/Ammoniak (75:20:5)
I	Chloroform/n-Heptan (65:35)
K	1-Butanol/Äthanol/Ammoniak (80:10:10)
L	Chloroform/Eisessig (95:5)
M	Methylacetat/Isopropanol/Ammoniak (45:35:20)
N	1-Butanol/Eisessig/Wasser (60:15:25)

Tabelle 2: nK_F -Werte in den Fließmittelsystemen

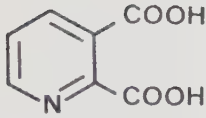
Fließmittelsystem:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N
Chinaldinsäure	25	48	17	43	40	30	6	64	14	13	8	46	55
Chinolinsäure	0	4	0	2	4	3	0	18	0	0	0	3	3
5-Hydroxyindol	83	82	95	88	55	96	-	100	10	93	42	-	-
5-Hydroxyindol-3-essigsäure	17	58	45	50	17	70	13	76	0	12	10	27	73
5-Hydroxytryptamin	58	21	0	6	17	9	0	60	0	24	0	63	47
5-Hydroxytryptophan	6	12	0	2	0	6	0	46	0	2	0	21	37
Indikan	78	19	0	25	0	33	0	90	0	36	0	-	-
Indol	84	98	100	100	81	95	95	100	27	100	95	94	79
Indol-3-essigsäure	18	85	74	96	38	93	35	76	0	22	70	30	75
Kynurenin	8	23	0	4	6	4	0	56	0	8	0	27	38
Kynurensäure	46	34	29	8	15	10	0	70	0	15	0	37	43
Nikotinsäure	36	59	23	52	62	59	9	66	0	19	5	37	47
Nikotinsäureamid	68	62	28	52	56	57	7	81	0	51	6	76	58
Pikolinsäure	8	25	9	21	19	15	2	47	0	9	2	-	-
Tryptamin	65	42	0	22	0	30	55	79	0	61	3	77	58
Tryptophan	7	23	0	17	0	25	0	50	0	15	0	27	45
Xanthurensäure	11	22.	0	5	14	0	0	47	0	4	0	43	47



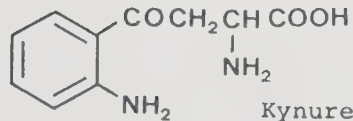
Chinaldinsäure



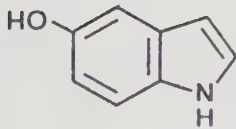
Indol-3-essigsäure



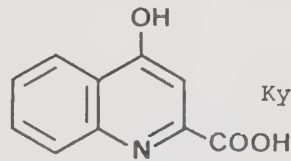
Chinolinsäure



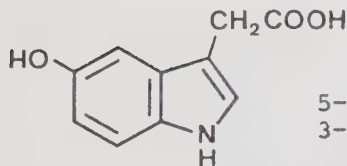
Kynurenin



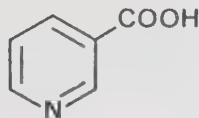
5-Hydroxyindol



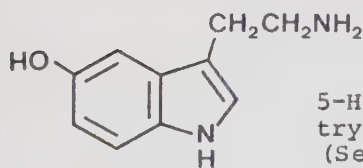
Kynurensäure



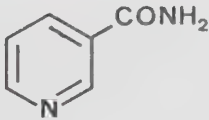
5-Hydroxyindol-3-essigsäure



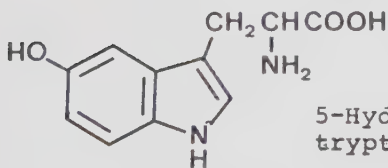
Nikotinsäure



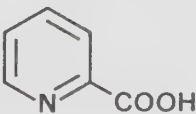
5-Hydroxytryptamin (Serotonin)



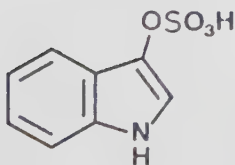
Nikotinsäureamid



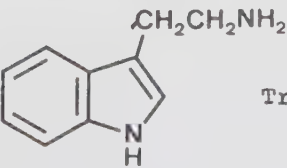
5-Hydroxytryptophan



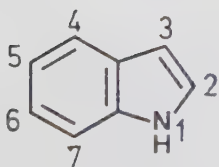
Pikolinsäure



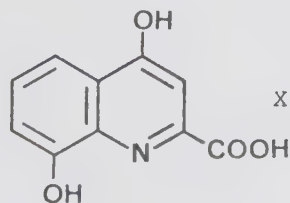
Indoxylschwefelsäure (Indikan)



Tryptamin



Indol



Xanthurensäure

Die Auswertung der Dünnschichtplatten erfolgte mit dem Dünnschicht-Chromatogramm-Auswertegerät Farrand VIS-UV II (Kontron). Es wurde im Zweistrahlverfahren bei 280 nm vermessen oder die Fluoreszenzminderung bei 254 nm Anregung und 523nm Analysator.

Substanzen wurden für identisch erklärt, wenn sie in mindestens drei verschiedenen Fließmittelsystemen denselben R_f -Wert ergaben wie der bekannte Standard.

Die quantitative Erfassung erfolgte mittels eines Standards, der zusätzlich auf jede Platte aufgebracht wurde. Die Peaks, die aus den Remissionsregistrierungen stammen, wurden entweder ausgeschnitten und gewogen, nach dem Standardverfahren Halbwertsbreite x Höhe oder der reinen Peakhöhenmethode ausgewertet.

Anwendung auf physiologische Proben

Die physiologische Flüssigkeit (Urin, Plasma) wird mit NaCl gesättigt, mit Ammoniak_c auf pH 10-11 gebracht und bei ca. 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge: Heraeus-Christ Typ UJ 1). Der Überstand wird 3 Mal mit einem Gemisch aus Diäthyläther/Cyclohexan/*t*-Butanol (80:10:10) ausgeschüttelt. Die vereinten Extrakte, welche die basischen und neutralen Metaboliten enthalten, werden am Rotationsverdampfer bei 40-50°C im Wasserstrahlvakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 1 ml Methanol aufgenommen und in der Kälte gelagert.

Die wässrige Phase der ersten Extraktion wird mit verdünnter HCl auf pH 4 eingestellt und erneut 3 Mal mit demselben Lösungsmittelgemisch wie oben extrahiert. Die vereinten Extrakte, welche die sauren Indole sowie die verschiedenen Säuren enthalten, werden ebenfalls wie oben zur Trockne eingengt, in Methanol aufgenommen und in der Kälte gelagert.

Nach der sauren Extraktion wird die wässrige Phase zur Trockne eingengt, der Kristallbrei gelockert und 3 Mal mit einem Gemisch aus Tetrachlorkohlenstoff/Äthanol/Ammoniak (60:35:5) je 30 Minuten geschüttelt. Nach Verdampfen des Lösungsmittels der vereinten Extrakte, die Indikan und Tryptophan enthalten, wird der Rückstand in Methanol/Ammoniak (99:1) aufgenommen und ebenfalls in der Kälte gelagert.

Die Auswahl der Fließmittelsysteme sowie ihre eventuelle kombinierte Anwendung erfolgt je nach interessierenden Substanzen gemäß der Methode von De Clercq und Massat (125) anhand der Tabelle 1. Diese Methode bedient sich einer Graphen-Methode, nämlich Kruskal's Algorithmus (126) zur Bestimmung der kleinsten Summe der Verbindungsstrecken in einem Netzwerk.

3) Durchführung der Tierversuche

Männlichen Inzucht-Ratten (Stamm Wistar) mit einem Gewicht von 180-250 g wurde 24 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter (Standard-Futter, Fa. Höveler) entzogen; sie bekamen Wasser ad libitum. Neben Normaltieren, die statt wirksamer Substanzen 0,9 %ige NaCl-Lösung erhielten, sonst aber gleich behandelt wurden, wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt:

a) Tryptophan-Belastung

Den Tieren wurde 0,125 mmol/100 g Körpergewicht L-Tryptophan, gelöst in 0,9 %iger NaCl-Lösung, intraperitoneal gespritzt.

b) Tryptophan-Belastung unter Hydrocortisoneinfluß

Allen Tieren wurde zum Zeitpunkt 0 0,5mg/100g Körpergewicht Letamethason (BYK-ESSEX, München) i.p. gegeben.

Zusätzlich bekamen sie nach 0,2,3,4 oder 5 Stunden 0,125 mmol/100 g Körpergewicht L-Tryptophan i.p. appliziert.

Urinproben wurden 12 Stunden im Stoffwechselkäfig (ohne Nahrungs- und Wassergaben) über festem NaCl gesammelt. Die Urinproben wurden gemäß den oben beschriebenen Schritten aufgearbeitet, Aliquots auf DC-Platten aufgebracht und nach erfolgter Trennung auf der Platte ("in situ") vermessen.

	Gewicht in g	ml Urin/12 h	Gehalt in $\mu\text{mol}/12$ Stunden an	
			Tryptophan	Kynurensäure Chinolinsäure
Normaltiere	215	13	18,8	1,5
	220	15		1,1
Tryptophan- Belastung	180	12	23,9	0,1
	190	11		1,4
Cortisol t=0	240	14	15	1
Tryptophan t=0	250	17		2,3
Cortisol t=0	190	14	59	1,8
Tryptophan t=2	195	11		2
Cortisol t=0	200	16	100	42,2
Tryptophan t=3	220	12		2
Cortisol t=0	210	11	56	31,7
Tryptophan t=4	220	14		0
Cortisol t=0	230	14	18,8	1
Tryptophan t=5	250	10		0

Literaturverzeichnis

- 1) Seiler N., Demisch L., Schneider H.;
Angew. Chem. 83 (1971) 53
- 2) Musajo L., Benassi C. A.; Adv. Clin. Chem. 7 (1964) 63
- 3) Price J. M., Brown R. R., Yess N.;
Adv. Metabol. Disorders 2 (1965) 159
- 4) Price J. M., Thornton M. J., Mueller L. M.;
Amer. J. Clin. Nutr. 20 (1967) 452
- 5) Schieverbein H., Kuntze I.;
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972) 179
- 6) Byrd D. J., Kochen W., Idzko D., Knorr E.;
J. Chromatogr. 94 (1974) 85
- 7) Kochen W., Byrd D. J., Bühner R., Bührlen E.;
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975) 1
- 8) Murakami K., Makiro K.; J. Biochem. 70 (1971) 533
- 9) Greenstein J. P., Winitz M.; in "Chemistry of the
Amino Acids"; New York, London, Sydney (1961) 3216
- 10) Bopp F.; Ann. 69 (1849) 16
- 11) Hopkins F. G., Cole S. W.; J. Physiol. 27 (1902) 418
- 12) Hopkins F. G., Cole S. W.; J. Physiol. 29 (1903) 451
- 13) Hopkins F. G., Cole S. W.;
Proc. Roy. Soc. (London) B 68 (1901) 21
- 14) Ellinger A.; Ber. 39 (1906) 2515
- 15) Mannich C., Koch W.; Ber. 75 (1942) 803
- 16) Snyder H. R., Smith C. W.;
J. Am. Chem. Soc. 66 (1944) 350

- 17) Albertson N. F., Archer S., Suter C. M.;
J. Am. Chem. Soc. 66 (1944) 500
- 18) Hegedüs B.; Helv. Chim. Acta 29 (1946) 1499
- 19) Hanks L. V., Brown R. R.; Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 129 (1968) 144
- 20) Birkofer L., Wetzel R.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol.
Chem. 264 (1940) 31
- 21) Feigelson P., Brady F. O.; J. Biol. Chem. 248 (1973) 5267
- 22) Knox W. E.; Biochem. J. 53 (1953) 379
- 23) Altman K., Greengard O.; J. Clin. Invest. 45 (1966) 1527
- 24) Sprince H., Lowy R. S., Folsome C. E., Behrman J. S.;
Am. J. Obstet. Gynecol. 62 (1951) 84
- 25) Vandelli I.; Acta Vitaminol. 5 (1951) 55
- 26) Rose D. P., Brown R. R.; Biochim. Biophys. Acta
184 (1969) 412
- 27) Rose D. P., Braidman J. P.; Amer. J. Clin. Nutr.
24 (1971) 673
- 28) McGinty P., Rose D. P.; Life Sci. 8 (1969) 1193
- 29) Foster D. O., Ray P. D., Lardy H. A.;
Biochem. 5 (1966) 563
- 30) Alvares F.L., Ray P. D.; J. Biol. Chem. 249 (1974) 2058
- 31) Mehler A. H., McDaniel E. G., Hundley J. M.;
J. Biol. Chem. 232 (1958) 323
- 32) Ikeda M., Tsuji H., Nakamura S., Ichiyama A.,
Nishizuka Y., Hayaishi O.; J. Biol. Chem. 240 (1965) 1395
- 33) Mehler A. H., Yano K., May E. L.; Science 145 (1964) 817
- 34) Ginoulhiac E., Tenconi L. T., Bonomi U.;
Acta Vitaminol. 18 (1964) 205

- 35) Cervinka O.; Chem. & Ind. (London) (1959) 1129
- 36) Ireland R. E.; Chem. & Ind. (London) (1958) 979
- 37) Nystrom R. F., Gurne D.; in "Proceedings of the
Second Internat. Conf. on Methods of preparing
and storing labelled Compounds", 28. Nov.-3. Dec.
1966, Brüssel
- 38) Moyer J. D., Isbell H. S.; Analyt. Chem. 29 (1957) 393
- 39) Kent R. E., McElvain S. M.; Org. Synth. Coll. Vol.
3 (1967) 591
- 40) Mathur G. P., Ng C. Y., Henderson L. M.;
J. Biol. Chem. 239 (1964) 2184
- 41) Dische R., Rittenberg D.; J. Biol. Chem. 211 (1954) 199
- 42) Leonard N. J., Wicks Z. W.; J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 2402
- 43) Fieser M., Fieser L. F.; in "Reagents for Organic
Synthesis", New York, London, Sydney 1967, I, S. 380
- 44) Brown H. C., Schlesinger H. I., Sheft I., Ritter D. M.;
J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 192
- 45) Grignard V., Vignon G.; Compt. rend. Acad. 144 (1907) 1358
- 46) West D., Rochow E.; J. Org. Chem. 18 (1953) 1739
- 47) Wright G. F.; in "Steric Effects in Organic Chemistry",
New York, New York 1956, S. 394
- 48) Roberts J. D., Caserio M. C.; in "Basic Principles
of Organic Chemistry", New York, Amsterdam 1965, S. 352
- 49) Vychovanec V. V.; CA (1968) 20-0990
- 50) Smiley R. A., Arnold C.; J. Org. Chem. 25 (1960) 257
- 51) Friedman L., Shechter H.; J. Org. Chem. 25 (1960) 877

- 52) Campbell K. N.; J. Am. Chem. Soc. 68 (1946) 1844
- 53) Krauch H., Kunz W.; in "Reaktionen der organischen Chemie", Heidelberg 1969^{IV}, S. 522
- 54) Pinkney P. S.; Org. Synth. Coll. Vol. II (1969¹⁴), S. 116
- 55) Fischer E., Speier A.; Ber. 28 (1895) 3252
- 56) Julian P. L., Oliver J. J.; Org. Synth. Coll. Vol. II (1943) 391
- 57) Gaylord N. G.; "Reduction with Complex Metal Hydrides" New York, London 1956
- 58) Schmidt M., Nordwig A.; Ber. 91 (1958) 506
- 59) Nystrom R. F., Brown W. G.; J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 1197
- 60) Org. Synth. 40 (1960) 14
- 61) Overberger C. G., Saunders J. H.; Org. Synth. 28 (1948) 31
- 62) Johnston A. C.; CA 39 (1945) 2001
- 63) Ziegler K.; Ann. 551 (1942) 80
- 64) Horner L., Winckelman E. H.; in "Neuere Methoden der organischen Chemie", Weinheim 1961, S. 98
- 65) Horner L., Winckelmann E. H., Angew. Chem. 71 (1959) 349
- 66) Djerassi C.; Chem. Rev. 43 (1948) 271
- 67) Organikum, Organisch-chemisches Grundpraktikum; Berlin 1970⁹, S. 265
- 68) Henecka H., Ott E.; in "Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie", Bd. 18, S. 384; Stuttgart 1952
- 69) Wolf H.; in "Organic Reactions", New York, Bd. III, S. 307
- 70) Coleman G. H.; Org. Synth. Coll. Vol. 1 (1941) 442
- 71) Henderson L. M., Rao D. R., Nystrom R. F.; in "C. S. Vestling (Hrsg.), Biochemical Preparations", Vol. 6, New York 1958, S. 90

- 72) Shaw K., Nolan C.; J. Org. Chem. 22 (1957) 1668
- 73) Shaw K., Nolan C.; J. Org. Chem. 22 (1957) 1670
- 74) Warner D. T., Moe O. A.; J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 2763
- 75) Warner D. T., Moe O. A.; J. Am. Chem. Soc. 70 (1948) 2765
- 76) Robinson B.; Chem. Rev. 63 (1963) 373
- 77) Fischer E., Jourdan F.; Ber. 16 (1883) 2241
- 78) Fischer E., Hess O.; Ber. 17 (1884) 559
- 79) Robinson G. M., Robinson R.; J. Chem. Soc. 113 (1918) 639
- 80) Allen C. F. H., Wilson C. V.; J. Am. Chem. Soc.
65 (1943) 611
- 81) Carlin R. B., Fischer E. E.; J. Am. Chem. Soc.
70 (1948) 3421
- 82) Abuzov A. E., Kitaev Y. P.; J. Gen. Chem. USSR
27 (1957) 2388
- 83) Snyder H. R., Smith C. W.; J. Am. Chem. Soc.
66 (1944) 350
- 84) Bauguess L. C., Berg C. P.; J. Biol. Chem. 104 (1934) 675
- 85) Grunwald C., Vendrell M., Stowe B. B.; Anal. Biochem.
20 (1967) 484
- 86) Stowe B. B., Thimann K. K.; Anal. Biochem. (1954) 499
- 87) Altschuler H., Gold M.; J. Chromatogr. Sc.
9 (1971) 377
- 88) Erook J. L., Biggs R. H., John P. A. S., Anthony D. S.;
Anal. Biochem. 18 (1967) 453
- 89) Bakri M., Carlson J. R.; Anal. Biochem. 34 (1970) 46
- 90) Chen N. C., Gholson R. K.; Anal. Biochem. 47 (1972) 139
- 91) Chen N. C., Gholson R. K., Raica N.;
Biochim. Biophys. Acta 343 (1974) 167

- 92) Raj R. K., Hutzinger O.; Anal. Biochem. 33 (1970) 43
- 93) Waworth C., Walmsley T. A.; J. Chromatogr.
66 (1972) 311
- 94) Anderson G. M.; J. Chromatogr. 105 (1975) 323
- 95) Yamamoto H., Kurita T., Suzuki J., Hira R., Nakano K.,
Makabe H., Shibata K.; J. Chromatogr. 116 (1976) 29
- 96) Treiber L. R.; J. Chromatogr. 100 (1974) 123
- 97) Shibata K.; Biochim. Biophys. Acta 304 (1973) 249
- 98) Goldman J., Goodall R. R.; J. Chromatogr. 32 (1968) 24
- 99) Goldman J., Goodall R. R.; J. Chromatogr. 40 (1969) 345
- 100) Goldman J., Goodall R. R.; J. Chromatogr. 47 (1970) 386
- 101) Goldman J.; J. Chromatogr. 78 (1973) 7
- 102) Boulton A. A., Pollak V.; J. Chromatogr. 45 (1969) 189
- 103) Pollak V., Boulton A. A.; J. Chromatogr. 45 (1969) 200
- 104) Pollak V., Boulton A. A.; J. Chromatogr. 50 (1970) 19
- 105) Pollak V.; Boulton A. A.; J. Chromatogr. 50 (1970) 30
- 106) Pollak V., Boulton A. A.; J. Chromatogr. 50 (1970) 39
- 107) Jork H.; J. Chromatogr. 33 (1968) 297
- 108) Salganicoff L., Kraybill M., Mayer D., Legallais V.;
J. Chromatogr. 26 (1967) 434
- 109) Sprince H., Parker C., Dawson J. T., Jaimeson D.,
Dohen F. C.; J. Chromatogr. 8 (1962) 457
- 110) Veneziale C. M., Walter P., Kneer N., Lardy H. A.;
Biochem. 6 (1967) 2129
- 111) Hanson R. L., Ray P. D., Walter P., Lardy H. A.;
J. Biol. Chem. 244 (1969) 4351
- 112) Snoke R. E., Johnston J. B., Lardy H. A.;
Eur. J. Biochem. 24 (1971) 342

Lebenslauf

Am 28. September 1944 wurde ich als Sohn der Eheleute Dr. jur. Ernst Förster und Edelgard, geb. Kawka, in Beuthen (OS) geboren. Ich bin verheiratet mit Gisela, geb. Post, und habe einen Sohn.

Ostern 1951 wurde ich in Krefeld eingeschult und ging seit dem Winterhalbjahr des ersten Schuljahres in Düsseldorf zur Volksschule. Seit Ostern 1955 besuchte ich altsprachliche Gymnasien in Düsseldorf und Köln. Ostern 1964 legte ich am Staatlichen Görres-Gymnasium - altsprachlicher Zweig - Düsseldorf die Reifeprüfung ab.

Vom Sommersemester 1964 an studierte ich Chemie an der Universität zu Köln und bestand das Diplomchemiker-Vorexamen im Herbst 1967. Im Sommersemester 1969 wechselte ich zur Universität Düsseldorf. Hier bestand ich die mündliche Diplomchemiker-Hauptprüfung im November 1969. Nach Abschluß meiner Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Kuchen im Institut für Anorganische Chemie der Universität Düsseldorf wurde mir die Diplomurkunde im August 1970 ausgehändigt.

Mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Staib im Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf zu Beginn des Jahres 1971.

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Professor Dr. Wolfgang Staib

danke ich für die Überlassung des Themas, für seine wertvollen Anregungen, weiterführenden Diskussionen, seine Betreuung und großzügige Unterstützung.

Ferner gilt mein Dank meinen Kollegen für hilfreiche Diskussionen sowie allen, die bei Laborarbeiten behilflich waren, vor allem Frau A. Guth und Frau B. Gutzmann.

